

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dottorato di Ricerca in
Biologia Funzionale dei Sistemi Cellulari e Molecolari
XIX Ciclo

**ANALISI DEL CIRCUITO DI
REGOLAZIONE RESPONSABILE DEL
CONTROLLO TRASCRIZIONALE DEI
GENI HEAT-SHOCK IN *Helicobacter pylori***

Settore Scientifico Disciplinare: **BIO/11**

Relatore:

Chiar.mo Prof.
VINCENZO SCARLATO

Presentata da:

Dr. **DAVIDE RONCARATI**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof.
VINCENZO SCARLATO

Bologna, 2007

Durante il Dottorato di Ricerca mi sono occupato dello studio della regolazione trascrizionale in seguito a stress ambientali in *Helicobacter pylori*; più in dettaglio, ho lavorato sul regolatore Fur e la risposta al ferro e, in particolare, ho approfondito lo studio della risposta heat-shock, argomento quest'ultimo del lavoro di tesi di seguito presentato.

Nel periodo del Dottorato di Ricerca sono stato co-autore dei seguenti lavori scientifici:

Spohn G., Danielli A., **Roncarati D.**, Delany I., Rappuoli R., Scarlato V. (2004). Dual control of *Helicobacter pylori* heat shock gene transcription by HspR and HrcA. *J. Bacteriol.* 2004; 186: 2956-2965.

Danielli A., **Roncarati D.**, Delany I., Chiarini V., Rappuoli R., Scarlato V. (2006). In vivo dissection of the *Helicobacter pylori* Fur regulatory circuit by genome-wide location analysis. *J. Bacteriol.* 188: 4654-4662.

Roncarati D., Spohn G., Tango N., Danielli A., Delany I., Scarlato V. (2007). Expression, purification and characterization of the membrane-associated HrcA repressor protein of *Helicobacter pylori*. *Protein Expr. Purif.* 51(2):267-75. Epub 2006 Aug 17.

Roncarati D., Danielli A., Spohn G., Delany I., Scarlato V. Dissection of the regulatory circuit controlling heat-shock gene transcription in *Helicobacter pylori*. In preparation.

Indice

A. RIASSUNTO	1
B. INTRODUZIONE	2
B.1 <i>Helicobacter pylori</i> : caratteristiche generali	2
B.2 Patogenesi ed interazione con l'ospite	2
B.3 Il genoma di <i>Helicobacter pylori</i>	4
B.4 I fattori di virulenza	6
B.4.1 Ureasi	6
B.4.2 Apparato flagellare	7
B.4.3 Molecole di adesione	8
B.4.4 Produzione di citotossine	8
B.4.5 Fattori che modulano la risposta immunitaria dell'ospite	10
B.4.6 Heat shock proteins	11
B.4.6.1 Organizzazione dei geni codificanti le heat shock proteins in <i>H. pylori</i>	13
B.5 Regolazione dell'espressione genica in <i>Helicobacter pylori</i>	15
B.5.1 Meccanismi di regolazione trascrizionale	15
B.5.1.1 I fattori sigma	16
B.5.1.2 I sistemi a due componenti	17
B.5.1.3 Altri regolatori trascrizionali	18
B.6 La regolazione trascrizionale dei geni codificanti le heat shock proteins	19
B.6.1 Strategie di regolazione trascrizionale dei geni heat shock nei procarioti	19
B.6.2 La regolazione trascrizionale dei geni heat shock in <i>Helicobacter pylori</i>	21
C. RISULTATI	26
C.1 Studio della localizzazione di HrcA in <i>H. pylori</i>	26
C.1.1 Analisi bioinformatica del regolatore HrcA	26
C.1.2 Associazione di HrcA con la membrana interna in <i>H. pylori</i>	28
C.2 Studio del meccanismo di repressione dei promotori 'heat-shock'	31
C.2.1 Overespressione di HrcA in <i>Escherichia coli</i>	31
C.2.2 Purificazione di His-HrcA	35
C.2.3 Legame della proteina His-HrcA al proprio promotore	37
C.2.4 Saggi di DNase I footprinting sui promotori <i>Pgro</i> e <i>Phrc</i> con le proteine HrcA and HspR	38
C.2.5 Il complesso GroES-GroEL modula positivamente il legame di HrcA al promotore <i>Phrc in vitro</i>	42

C.3	Analisi trascrizionale con DNA-macroarrays	44
C.3.1	Trascrittomi di HrcA e HspR	44
C.3.2	Primer extension su geni identificati dai trascrittomi di HrcA e HspR	49
C.3.3	HrcA e HspR sono necessari per la motilità in <i>H. pylori</i>	51
D. DISCUSSIONE		53
D.1	Analisi bioinformatica e localizzazione subcellulare di HrcA	54
D.2	Espressione e purificazione di HrcA	54
D.3	Definizione dei siti di legame di HrcA sui promotori <i>Pgro</i> e <i>Phrc</i> e regolazione post-trascrizionale di HrcA ad opera della chaperonina GroE	55
D.4	Analisi dei trascrittomi e fenotipo non-motile	57
E. MATERIALI		60
E.1	Ceppi batterici	60
E.2	Plasmidi e costrutti	61
E.3	Oligonucleotidi	64
E.4	Terreni di coltura	65
E.5	Piastre	66
E.6	Reagenti chimici ed enzimi	67
E.7	Strumentazione	68
F. METODI		69
F.1	Condizioni di crescita dei ceppi batterici	69
F.2	Saggio di motilità su piastra	69
F.3	Preparazione di cellule competenti di <i>E. coli</i>	69
F.4	Trasformazione di cellule <i>E. coli</i>	70
F.5	Trasformazione di <i>H. pylori</i>	70
F.6	Generazione di ceppi mutanti e complementanti di <i>H. pylori</i>	70
F.7	Conservazione dei ceppi batterici	71
F.8	Manipolazione del DNA	71
F.9	Ligazione di frammenti di DNA all'interno di vettori	71
F.10	Estrazione di DNA genomico da cellule di <i>H. pylori</i>	71
F.11	Reazione a catena della polimerasi (PCR)	72
F.12	Deprotezione degli oligonucleotidi	72
F.13	Analisi di acidi nucleici attraverso gel di agarosio	72
F.14	Analisi di proteine attraverso SDS-PAGE	73
F.15	Colorazione del gel di poliacrilammide con blu di Coomassie	74
F.16	Western Blot	74
F.17	Espressione e purificazione di proteine ricombinanti	75
F.18	Over-espressione di HrcA	76
F.19	Purificazione della proteina ricombinante His-HrcA	77
F.20	Preparazione della membrana interna da cellule di <i>H. pylori</i> per ultracentrifugazione su gradiente di saccarosio	77
F.21	Quantificazione spettrofotometrica di campioni proteici (Bradford assay)	78

F.22 Analisi di frammenti di DNA marcati radioattivamente attraverso elettroforesi su gel di poliacrilammide denaturante	78
F.23 Filter binding assay	79
F.24 Marcatura radioattiva di frammenti di DNA ad una estremità	80
F.25 DNase I footprinting	81
F.26 Reazione di sequenza G+A (Maxam and Gilbert sequencing reaction)	82
F.27 Estrazione dell'RNA totale da cellule di <i>H. pylori</i>	82
F.28 Marcatura di oligonucleotidi all'estremità 5'	83
F.29 Primer extension	83
F.30 Analisi dei trascrittomi	84

G. BIBLIOGRAFIA **86**

A. Riassunto

Helicobacter pylori, un patogeno umano in grado di colonizzare la nicchia gastrica, è associato a patologie del tratto gastrointestinale di varia gravità. Per sopravvivere nell'ambiente ostile dello stomaco dell'ospite, e mettere in atto un'infezione persistente, il batterio si serve di una serie di fattori di virulenza che includono anche le proteine Heat Shock (chaperone). I principali geni codificanti le proteine chaperone in *H. pylori* sono organizzati in tre operoni trascritti dall'RNA polimerasi contenente il fattore sigma vegetativo σ^{80} . La trascrizione di due dei tre operoni è regolata negativamente da due regolatori trascrizionali, HspR e HrcA, mentre il terzo operone è represso solo da HspR. Fino ad ora, studi molecolari per la comprensione del ruolo di ciascuna proteina nel controllo trascrizionale dei geni heat shock sono stati ostacolati dalla citotossicità ed insolubilità di HrcA quando espressa in sistemi eterologhi.

In questo lavoro, è stata analizzata la sequenza amminoacidica di HrcA ed è stata confermata sperimentalmente la predizione bioinformatica della sua associazione con la membrana interna. La citotossicità e l'insolubilità di HrcA in *E. coli* sono state alleviate inducendone l'espressione a 42°C. Saggi *in vitro* con le proteine ricombinanti purificate, HspR e HrcA, hanno consentito di definire i siti di legame dei due repressori sui promotori degli operoni heat shock. Ulteriori saggi *in vitro* hanno suggerito che l'affinità di HrcA per gli operatori è aumentata dalla chaperonina GroESL. Questi dati contribuiscono parzialmente alla comprensione del meccanismo di repressione della trascrizione espletato da HrcA e HspR e permettono di ipotizzare il coinvolgimento di altri regolatori trascrizionali. L'analisi di RNA estratti dal ceppo selvatico e dai mutanti *hrcA*, *hspR* e *hrcA/hspR* di *H. pylori* su DNA-microarrays non ha evidenziato il coinvolgimento di altri regolatori trascrizionali, ma ha permesso l'identificazione di un gruppo di geni indotti da HrcA e/ HspR. Questi geni sono coinvolti nella biosintesi e regolazione dell'apparato flagellare, suggerendo un'interconnessione tra la risposta heat shock e la motilità e chemiotassi del batterio.

B. Introduzione

B.1 *Helicobacter pylori*: caratteristiche generali

Helicobacter pylori è un microrganismo Gram negativo, spirilliforme, microaerofilo a crescita lenta, munito di flagelli, isolato per la prima volta nel 1983 dal patologo Robin Warren e dal microbiologo Barry Marshall da una biopsia gastrica di un paziente sofferente di ulcera duodenale (Marshall and Warren, 1984). L'importanza di tale scoperta risulta evidente se si considera che fu la prima volta che si riuscì ad associare un preciso agente eziologico (la presenza del batterio nello stomaco) con l'insorgenza di una serie di patologie di varia gravità a carico del tratto gastrointestinale. Fino ad allora, infatti, si riteneva che l'ulcera peptica fosse una malattia correlata allo stress e ad altri fattori come, ad esempio, la sovrapproduzione di acidi gastrici. Data l'importanza di tale scoperta, nel 2005, R. Warren e B. Marshall sono stati insigniti del premio Nobel per la medicina.

Data la somiglianza, per molti aspetti, con *Campylobacter*, inizialmente questo microrganismo fu classificato come *Campylobacter pyloridis*, poi corretto in *Campylobacter pylori*. Fu solo nel 1989 che, viste le differenze da *Campylobacter* in importanti aspetti, quali ad esempio, la morfologia del flagello, il contenuto in acidi grassi e la sequenza dell'RNA 16S, venne definitivamente rinominato *Helicobacter pylori* (Goodwin and Armstrong, 1990). Negli anni seguenti sono state identificate nuove specie ed il genere *Helicobacter* si è rapidamente espanso.

L'habitat naturale di *H. pylori* si trova negli strati più profondi del muco che riveste l'epitelio gastrico, appena al di sopra del tappeto di cellule parietali, dove crea un ambiente fortemente basico grazie alla formazione di ioni ammonio dall'urea ambientale, reazione catalizzata dall'enzima ureasi.

B.2 Patogenesi ed interazione con l'ospite

H. pylori è oggi considerato uno dei più importanti e diffusi patogeni gastrointestinali umani: è noto, infatti, che è in grado di colonizzare in modo persistente lo stomaco di circa il 50% della popolazione mondiale, con punte

superiori all'80% nei paesi in via di sviluppo (Taylor and Blaser, 1991). Alcune teorie propongono che le diverse specie di *Helicobacter* siano abitanti nativi dello stomaco umano e varie evidenze supportano l'idea di una co-evoluzione di *H. pylori* e l'uomo (Blaser and Berg, 2001): secondo tale teoria, durante questo processo co-evolutivo, sarebbero stati selezionati i batteri in grado di indurre un danno tissutale sufficiente a liberare i nutrienti necessari per la loro sopravvivenza, ma non tanto gravi da minacciare la sopravvivenza dell'ospite.

La colonizzazione della mucosa gastrica avviene tipicamente durante il periodo infantile, probabilmente in seguito a contatti interpersonali per via orale o oro-fecale (Blaser, 1993; Thomas et al., 1992). Tipicamente, il 10% dei soggetti infetti sviluppa nel tempo patologie gastrointestinali di varia gravità, che vanno da gastriti acute a lesioni pre-cancerose (Figura 1).

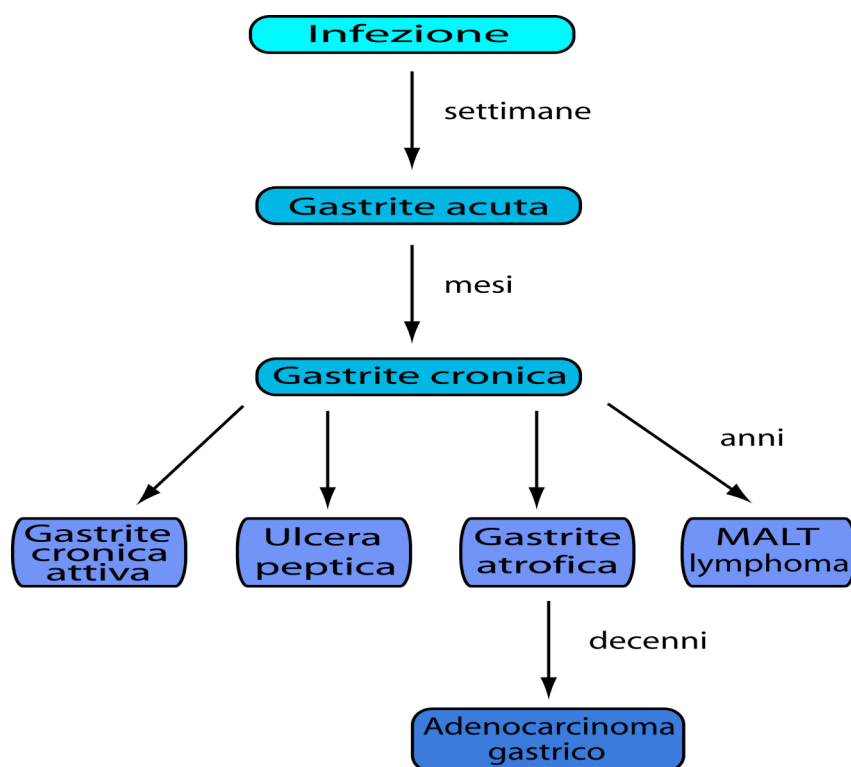


Figura 1. Rappresentazione schematica della progressione dell'infezione dell'ospite da parte di *H. pylori*. Una iniziale gastrite acuta può degenerare nel corso degli anni fino a vere e proprie forme cancerose come l'adenocarcinoma gastrico.

Come si può vedere riassunto in Figura 1, dopo qualche settimana a seguito dell'infezione, si possono avere le prime manifestazioni, sotto forma di ulcera acuta che, nel corso dei mesi successivi può cronicizzare e trasformarsi in gastrite cronica. Nel corso degli anni successivi, poi, diversi fattori quali il genotipo del batterio infettante, il genotipo dell'ospite e una serie di variabili ambientali possono concorrere allo sviluppo di patologie più gravi come ulcere peptiche, gastriti croniche ulceranti, linfomi di tipo non-Hodgkin (MALT-lymphoma) e gastriti atrofiche che possono nel tempo evolvere in adenocarcinomi (Ernst and Gold, 2000).

Comunque, in numerosi casi, l'infezione di *H. pylori* persiste negli anni senza indurre manifestazioni cliniche nell'ospite, indicando che, a livello della mucosa gastrica, sussiste un equilibrio ospite-patogeno evidentemente benefico per entrambi. Alcuni dati recenti, inoltre, mostrano che, in una piccola sottopopolazione di individui infetti, l'infezione da *H. pylori* durante l'infanzia sembrerebbe addirittura proteggere l'ospite dallo sviluppo di gravi malattie da reflusso gastrico e adenocarcinoma dell'esofago (Blaser, 1999). I fattori ed i meccanismi che concorrono alla rottura di questo delicato equilibrio, e che portano, quindi, in alcuni individui, allo sviluppo delle patologie descritte in precedenza, sono ancora tutt'oggi oggetto di indagine da parte della comunità scientifica.

B.3 Il genoma di *Helicobacter pylori*

Nel corso dell'ultimo decennio è stato portato a termine il sequenziamento completo del genoma di tre diversi ceppi di *H. pylori*. I ceppi 26695 e J99, isolati rispettivamente negli Stati Uniti nel 1994 da un paziente sofferente di ulcera duodenale (Eaton et al., 1989) e nel Regno Unito nei primi anni '80 da un paziente affetto da gastrite, sono stati sequenziati alla fine degli anni '90 (Alm et al., 1999; Tomb et al., 1997); a questi si è recentemente aggiunto il ceppo HPAG, isolato in California da un paziente affetto da gastrite atrofica cronica (ChAG) e sequenziato nel 2006 (Oh et al., 2006). Dal confronto di queste sequenze disponibili sono emerse importanti informazioni.

Innanzitutto, il genoma risulta essere mediamente pari a 1.6 Mb (1.59-1.67 Mb), con un numero di ORFs predette attorno alle 1500-1600. Se

confrontato con le dimensioni dei genomi di altri microrganismi Gram negativi, esso risulta essere relativamente piccolo (ad esempio il genoma di *E. coli* conta 4,2 Mb). I diversi ceppi sequenziati mostrano alcune caratteristiche comuni, come un basso contenuto in G+C, pari solo al 39% dell'intero genoma, una lunghezza media delle ORFs pari a 950 basi (valore simile a quello di altri microrganismi) e la percentuale di sequenze codificanti che si attesta attorno al 91% del genoma. Un'analisi della composizione amminoacidica delle proteine codificate da *H. pylori*, rivela la presenza di un'alta percentuale di amminoacidi basici come arginina e lisina, rispetto ad esempio al valore riscontrato in altri batteri quali *E. coli* e *H. influenzae*; inoltre, il 70 % delle proteine predette ha un punto isoelettrico superiore a 7. Queste ultime peculiarità potrebbero essere dovute all'ambiente particolarmente acido a cui *H. pylori* si deve adattare.

A fronte di queste caratteristiche generali, comuni tra i diversi ceppi, vari studi eseguiti utilizzando tecniche di 'molecular typing', quali RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), MLST (Multi-Locus Sequence Typing) e PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) hanno evidenziato un alto grado di diversità genetica (Achtman et al., 1999; Akopyanz et al., 1992; Go et al., 1996; Jiang et al., 1996). Anche dal semplice confronto dei ceppi sequenziati emergono importanti differenze nella struttura del genoma. Ad esempio, sono state identificate un totale di dieci inversioni e trasposizioni tra i ceppi: sussistono infatti numerose inversioni tra i ceppi 26695 e J99, mentre si identificano varie inversioni e traslocazioni, in regioni che vanno da 1.5 a 83.6 kb, nel ceppo HPAG (Alm et al., 1999; Oh et al., 2006). I geni ortologi, in comune ai ceppi 26695 e J99, mostrano un'identità di sequenza pari a solo il 92.6%, e solo 2 dei 1406 geni condivisi hanno sequenze nucleotidiche identiche; inoltre il 7% delle sequenze codificanti, identificate in questi ceppi, codificano per geni ceppo-specifici (Alm and Trust, 1999). E' stato osservato che in *H.pylori* co-esistono meccanismi di diversificazione, che operano durante la colonizzazione dell'ospite appunto per creare la diversità descritta in precedenza, e meccanismi conservativi che si oppongono e controllano questa infedeltà genetica. Alcuni modelli propongono che le tensioni tra l'integrità genomica e la diversificazione in *H. pylori* possano concorrere a favorire la persistenza del patogeno nell'ospite, creando un insieme di varianti

genetiche in grado di adattarsi alle innumerevoli nicchie presenti nello stomaco (Kang and Blaser, 2006).

B.4 I fattori di virulenza

Come fattori di virulenza, possono essere identificati tutti gli effettori che consentono al microrganismo patogeno di contattare ed invadere l'organismo ospite e di stabilire un'infezione persistente. Tali fattori sono coinvolti direttamente in tutti i passaggi fondamentali della patogenesi e verranno, di seguito, presi brevemente in considerazione.

B.4.1 Ureasi

All'interno del lume dello stomaco l'ambiente si presenta particolarmente ostile, vista l'estrema acidità (pH circa pari a 2). *H. pylori*, per sopravvivere in queste condizioni estreme, si avvale di un enzima chiamato ureasi. Questo enzima, così altamente espresso in *H. pylori* da rappresentare il 10% delle proteine cellulari totali, catalizza l'idrolisi dell'urea, che normalmente si trova nelle secrezioni gastriche, in ioni ammonio e diossido di carbonio (Labigne et al., 1991), riuscendo così a basificare il microambiente in cui il batterio si trova (Figura 2). Va inoltre sottolineato che gli ioni ammonio che si formano, di per se non tossici, possono concorrere, attraverso l'equilibratura con acqua, alla formazione di ioni idrossido: questi ultimi sembrano avere un potente effetto citotossico nei confronti delle cellule epiteliali.

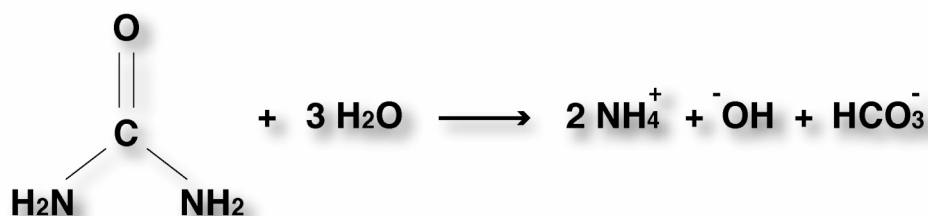


Figura 2. Reazione di idrolisi dell'urea, catalizzata dall'enzima ureasi.

Negli anni scorsi, attraverso l'utilizzo di ceppi mutanti per l'ureasi, è stato dimostrato sperimentalmente che tale enzima è essenziale per la

colonizzazione in modelli animali (Eaton and Krakowka, 1994; Tsuda et al., 1994). Da un punto di vista strutturale, l'ureasi è un grande enzima (550 kDa) multimerico, composto da sei copie di ciascuna delle due differenti subunità strutturali chiamate UreA (26.5 kDa) e UreB (61 kDa) e contenente vari ioni Ni^{2+} . Proprio gli ioni nichel, presenti in due copie nel sito attivo di ciascuna delle sei subunità UreB, sono di fondamentale importanza per l'attività dell'enzima. Nel citoplasma, il processo di inserimento di questi ioni è catalizzato da 5 proteine accessorie (UreI, UreE, UreF, UreG, UreH).

B.4.2 Apparato flagellare

Un altro fattore determinante per la colonizzazione dello stomaco da parte di *H. pylori* è l'apparato flagellare, composto da più di 40 geni sparsi per tutto il genoma. La dipendenza di *H. pylori* da un apparato flagellare completamente funzionale nel suo habitat naturale può essere meglio apprezzata considerando che la mutagenesi di uno qualsiasi dei geni coinvolti nella motilità e nella chemiotassi rende il patogeno inabile a colonizzare l'ospite (Foyne et al., 2000; Kavermann et al., 2003; Kim et al., 1999; Ottemann and Lowenthal, 2002).

H. pylori possiede da 4 a 7 flagelli unipolari che gli permettono di muoversi rapidamente nel lume dello stomaco ed attraverso lo strato di muco sovrastante le cellule epiteliali. Il flagello è formato da un filamento proteico circondato da uno strato membranoso che lo protegge dal basso pH ambientale (Suerbaum, 1995). Il filamento è composto da un co-polimero di flagellina A (FlaA) (Haas et al., 1993; Leying et al., 1992), la più abbondante, e flagellina B (FlaB) (Kostrzynska et al., 1991): le sequenze amminoacidiche delle due flagelline sono considerevolmente simili (identità del 58%), ma i relativi geni, *flaA* e *flaB*, risiedono in parti diverse del genoma (Suerbaum et al., 1993). Il filamento flagellare appena descritto è collegato al corpo basale dall'uncino (flagellar hook), codificato dal gene *flgE* (O'Toole et al., 1994). Molti altri componenti classici del sistema flagellare, comuni ad altri microrganismi, sono stati ritrovati ed identificati anche nel genoma di *H. pylori* (Tomb et al., 1997). Molto complessa ed ancora completamente da chiarire risulta essere la fine regolazione messa in opera dal patogeno, sia attraverso fattori sigma specifici, sia ad opera di sistemi a due componenti

(vedi capitoli successivi) (Niehus et al., 2004; Spohn and Scarlato, 1999a). Questo aspetto sottolinea l'importanza del movimento flagellare tra le strategie di attacco messe in atto da *H. pylori*.

B.4.3 Molecole di adesione

Una volta penetrato all'interno dell'ospite ed aver raggiunto lo strato mucoso che riveste l'epitelio gastrico, *H. pylori* deve strettamente aderire alle cellule epiteliali per poter mettere in atto un'infezione persistente. Per fare ciò si avvale di una serie di proteine chiamate adesine le quali, interagendo con recettori presenti sulle cellule epiteliali dello stomaco umano, consentono al patogeno di ancorarsi stabilmente. Diverse molecole di adesione sono state caratterizzate e tra le principali vanno ricordate HpaH, una lipoproteina legante l'N-acetil-neuroaminyl-lattosio (O'Toole et al., 1995, Evans, 1993 #114), BabA, un'adesina legante un antigene di Lewis di gruppo b fucosilato (Ilver et al., 1998), AlpA e AlpB, due proteine della membrana esterna simili a porine (Odenbreit et al., 1999) e KatA, la catalasi di *H. pylori*, la quale sembra mediare l'attacco a residui di fosfatidiletanolamina sulla superficie delle cellule epiteliali (Odenbreit et al., 1996). E' interessante notare il possibile coinvolgimento di alcuni membri della famiglia delle heat shock proteins nel processo di adesione: la chaperonina GroEL, nota anche come HspB, sembra interagire con i glicolipidi presenti sulle cellule epiteliali (Huesca et al., 1996); un ruolo analogo pare sia svolto anche dalla proteina DnaK (Hsp70), trovata sulla superficie cellulare (Huesca et al., 1996).

B.4.4 Produzione di citotossine

Tra i più importanti effettori coinvolti nel danno tissutale a livello dell'epitelio gastrico e nella manifestazione clinica dell'infezione da *H. pylori*, vanno ricordati la citotossina vacuolizzante VacA e la proteina CagA.

La tossina vacuolizzante VacA, nella sua forma attiva, consiste in un grosso complesso oligomero ad alto peso molecolare (circa 900 kDa) con una conformazione ad anello, formato da sei/sette subunità strutturali di peso molecolare compreso tra 87 e 95 kDa. In particolare, il gene *vacA* codifica per una proto-tossina di 139 kDa che, successivamente, viene processata e secreta, processo probabilmente a carico del frammento carbossiterminale della proto-

tossina stessa (Cover and Blaser, 1992; Lupetti et al., 1996). VacA interferisce con il normale traffico vescicolare all'interno della cellula bersaglio: la forma attiva della tossina, infatti, si lega alla superficie delle cellule epiteliali, viene internalizzata e induce la formazione di vacuoli, bloccando in tal modo il traffico vescicolare allo stadio di formazione degli endosomi (de Bernard et al., 1995; Papini et al., 1994).

La proteina CagA è uno dei fattori principalmente coinvolti nello sviluppo di disturbi gastrici a seguito dell'infezione da *H. pylori* (Covacci et al., 1993; Weel et al., 1996). CagA è considerata uno degli antigeni maggiormente immunodominanti del batterio: è stata osservata infatti un'alta correlazione tra la presenza di anticorpi diretti contro CagA e la presenza e/o la gravità di lesioni gastroduodenali in pazienti infetti. Questa proteina di superficie di 130 kDa è codificata dal gene *cagA*, appartenente alla cosiddetta isola di patogenicità (*cag pathogenicity island*, PAI), una regione genomica di 40 kb codificanti per 30 proteine coinvolte in diverse fasi dell'infezione (Censini et al., 1996; Covacci et al., 1997). Da notare che il contenuto in G+C di questa regione risulta essere del 35%, considerevolmente più basso rispetto alla media del genoma, il che potrebbe far supporre un'acquisizione dall'esterno di questa regione, probabilmente tramite trasferimento orizzontale. Per quanto riguarda il contributo di questa regione al danno tissutale a seguito dell'infezione, sembra che le proteine associate all'isola di patogenicità *cag* inducano la produzione di chemochine, ed in particolare di IL-8, da parte delle cellule dello stomaco, contribuendo in tal modo al danneggiamento della mucosa; inoltre, la PAI sembrerebbe indurre un aumento della secrezione acida da parte delle cellule epiteliali, con conseguente sviluppo di ulcere (Crabtree et al., 1992).

Infine, alcuni studi sembrano indicare il coinvolgimento di altri enzimi, ad esempio proteasi, nell'induzione del danno a carico delle cellule dell'epitelio gastrico (Mobley et al., 2001).

B.4.5 Fattori che modulano la risposta immunitaria dell'ospite

Una volta colonizzata con successo la mucosa gastrica dell'ospite, *H. pylori* deve contrastare in qualche modo la risposta immunitaria messa in atto dall'ospite, altrimenti il batterio verrebbe rapidamente eliminato. A seguito dell'infezione da *H. pylori*, l'organismo ospite scatena una vigorosa risposta immunitaria sia innata, attraverso l'interazione con il Toll-like receptor di tipo 2 (TLR2) (Lepper et al., 2005), che acquisita, come manifestato dal rilascio di citochine da parte delle cellule epiteliali e dall'infiltrazione di neutrofili, macrofagi e linfociti nella mucosa gastrica (attraverso l'espressione della proteina NapA, (Del Giudice et al., 2001)), così come dall'induzione di una risposta umorale specifica (Lindholm et al., 1998; Lindholm et al., 2001; Mohammadi et al., 1996; Mohammadi et al., 1997; Noach et al., 1994; Rossi et al., 2000). Per far fronte a questa situazione, *H. pylori* si avvale di una serie di meccanismi per evadere o attenuare la risposta immunitaria sia innata che acquisita. Innanzitutto, il lipopolisaccaride (LPS) espresso da *H. pylori* ha bassa attività immunogenica, se confrontato con quello di altri batteri, contenendo epitopi degli antigeni di Lewis molto simili a quelli presenti sulle cellule della mucosa gastrica (Moran et al., 1997; Muotiala et al., 1992). Inoltre, *H. pylori* è in grado di evadere l'interazione con il Toll-like receptor 5 (TLR5), una proprietà che favorisce la persistenza del patogeno sulla superficie della mucosa gastrica (Andersen-Nissen et al., 2005). Come ulteriore esempio, le arginasi espresse da *H. pylori* abbassano i livelli di ossido nitrico prodotto dai macrofagi (Gobert et al., 2001). Ancora, un'efficiente fagocitosi ed eliminazione di *H. pylori* sono ostacolate dalla presenza dell'isola di patogenicità *cag*, che codifica per un sistema di secrezione di tipo IV (Allen et al., 2000; Ramarao et al., 2000); infine, la stessa citotossina VacA inibisce l'attivazione e la corretta funzionalità delle cellule T (Gebert et al., 2003; Molinari et al., 1998). Ulteriori meccanismi che potrebbero contribuire ad evitare gli effetti dannosi per il batterio dovuti alla risposta immunitaria dell'ospite potrebbero coinvolgere gli enzimi superossido dismutasi (Spiegelhalder et al., 1993) e/o catalasi (Odenbreit et al., 1996), i quali potrebbero detossificare radicali reattivi dell'ossigeno prodotti dai leucociti polimorfonucleati.

B.4.6 Heat shock proteins

Ai fattori di virulenza sopra evidenziati, va incluso anche un gruppo di proteine, note come 'heat-shock proteins', che vengono indotte in condizioni di stress ed aiutano il batterio all'adattamento ed alla sopravvivenza in condizioni avverse. In particolare, le proteine chaperone sono state definite come 'una famiglia di proteine cellulari che mediano il ripiegamento corretto di altri polipeptidi, e in alcuni casi il loro assemblaggio in strutture oligomeriche, ma che non fanno parte della struttura finale' (Ellis, 1987; Ellis, 1990). Le proteine chaperones, quindi, interagiscono transientemente con proteine target, prevenendo in tal modo la formazione di ripiegamenti non corretti che possono portare alla formazione di aggregati proteici deleteri per la cellula. L'interazione tra chaperone e proteina target sembra avvenire a livello di superfici idrofobiche esposte della proteina non ancora ripiegata nella conformazione finale: dopo diversi cicli di legame e rilascio, spesso sostenuti da idrolisi di ATP, la proteina target viene rilasciata nella sua forma tridimensionale corretta. Esistono storicamente varie classi in cui sono state raggruppate le heat shock proteins in base al loro peso molecolare: fra queste, le due più importanti e meglio caratterizzate sono le classi Hsp60 e Hsp70, rappresentate, nel mondo batterico, rispettivamente, dalle proteine GroEL e DnaK. La centralità di questi effettori nella fisiologia del batterio risulta evidente se si considerano alcuni aspetti: ad esempio GroEL e DnaK sono fra le proteine più abbondanti nella cellula; inoltre, è stato calcolato che dal 20% al 30% di tutte le proteine nel citoplasma procariotico (all'incirca 10000 polipeptidi al minuto in *E. coli*) transitano attraverso il complesso di GroEL e di DnaK prima di acquisire il ripiegamento finale corretto (Bukau et al., 2000; Ewalt et al., 1997; Teter et al., 1999). Le proteine che non raggiungono un ripiegamento corretto vanno incontro a degradazione proteolitica. E' stato stimato che circa il 20% di tutti i polipeptidi sintetizzati nella cellula non raggiungono mai la loro collocazione finale o per errori durante la trascrizione o la traduzione oppure perché non hanno raggiunto il ripiegamento corretto (Wickner et al., 1999); prima che vi sia un accumulo deleterio di queste proteine, esse sono digerite da parte di proteasi specifiche (Figura 3A) (Gottesman, 1996).

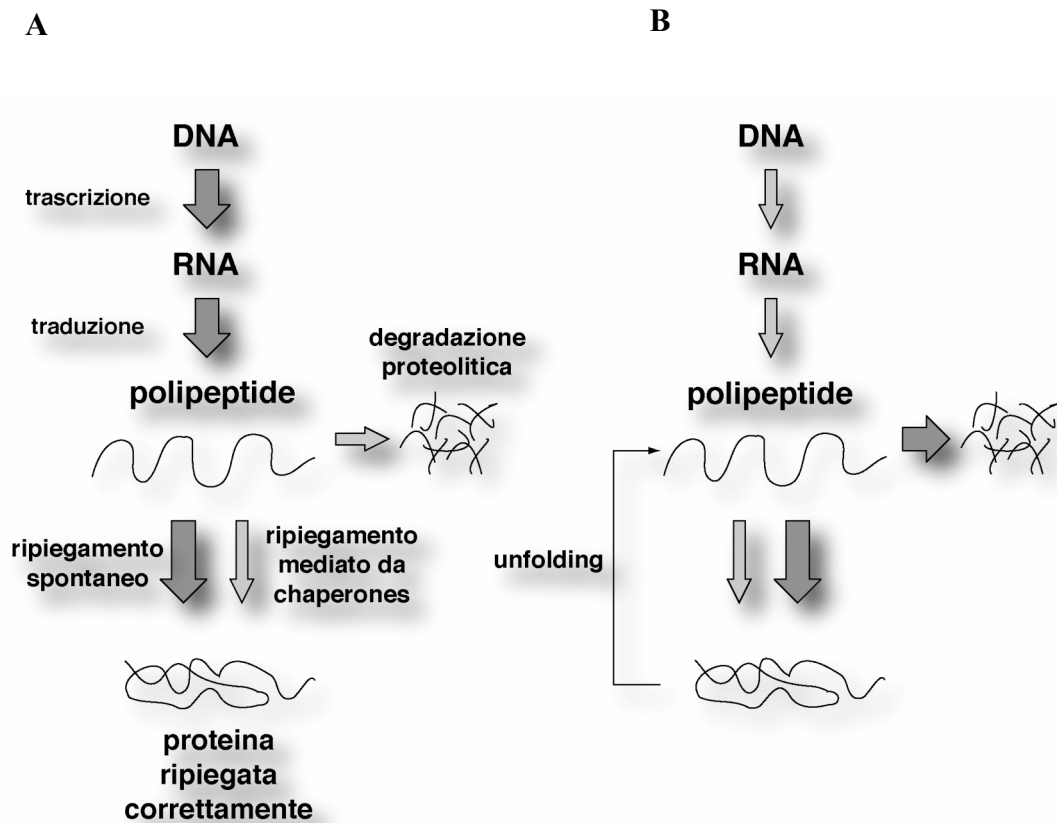


Figura 3. Modello semplificato del controllo di qualità delle proteine neosintetizzate in condizioni normali di crescita ed in condizioni di heat shock. (A) In condizioni normali di crescita, i livelli di trascrizione e di traduzione risultano elevati e la maggior parte delle proteine neosintetizzate si ripiega spontaneamente, senza l'intervento di chaperones; poche proteine si aggregano e vanno incontro a degradazione proteolitica. (B) In condizioni di shock termico, i livelli di trascrizione e di traduzione risultano ridotti; proteine già ripiegate vengono denaturate dall'agente causa dello stress e ritornano al sistema di controllo qualità mediato da chaperones, che diventa preponderante rispetto al ripiegamento spontaneo; una maggiore quantità di proteine. Adattato da (Narberhaus, 2002)

Se le chaperonine sono di vitale importanza in condizioni normali di crescita del microrganismo, esse assumono un ruolo chiave ancor più evidente in condizioni di stress. Infatti, variazioni di temperatura, cambiamenti osmotici, presenza di antibiotici, solventi e di altri agenti chimici non solo interferiscono con la trascrizione, la traduzione ed il corretto folding di proteine neosintetizzate, ma spesso vanno a denaturare la struttura tridimensionale di proteine che già hanno acquisito il ripiegamento corretto; è evidente che in condizioni di stress si ha un'induzione dell'espressione delle chaperonine per far fronte a questa situazione. Il ripiegamento assistito da

chaperones diventa preponderante rispetto a quello spontaneo ed un maggior numero di proteine non raggiunge il ripiegamento corretto e viene rimosso da proteasi specifiche (Figura 3B).

In *H. pylori* si ritrovano tutte le principali heat shock proteins, prevalentemente codificate in tre operoni multicistronici, descritti nel dattaglio nel paragrafo successivo. Questo gruppo di proteine deve essere sicuramente incluso fra i fattori di virulenza: le chaperonine di *H. pylori*, infatti, oltre ad essere coinvolte nel fenomeno di adesione cellulare (in particolare GroEL e DnaK), come descritto sopra, consentono anche al batterio di far fronte a stress ed a variazioni ambientali che hanno luogo nella mucosa gastrica.

B.4.6.1 Organizzazione dei geni codificanti le heat shock proteins in *H. pylori*

In *H. pylori*, i geni codificanti le principali heat shock proteins sono raggruppati in tre operoni multicistronici controllati a monte da tre promotori distinti. In Figura 4, è riportata una rappresentazione schematica di tali operoni.

Il primo operone, in alto in Figura 4, contiene i geni denominati *cbpA*, *hspR* ed *helicase-like*. Per quanto riguarda il primo gene dell'operone, esso codifica per una proteina omologa ad una DnaJ-like trovata in *E. coli* chiamata appunto CbpA (curved-DNA binding protein A): la proteina di *H. pylori*, in particolare, mostra una omologia di sequenza del 30% (Ueguchi et al., 1994).

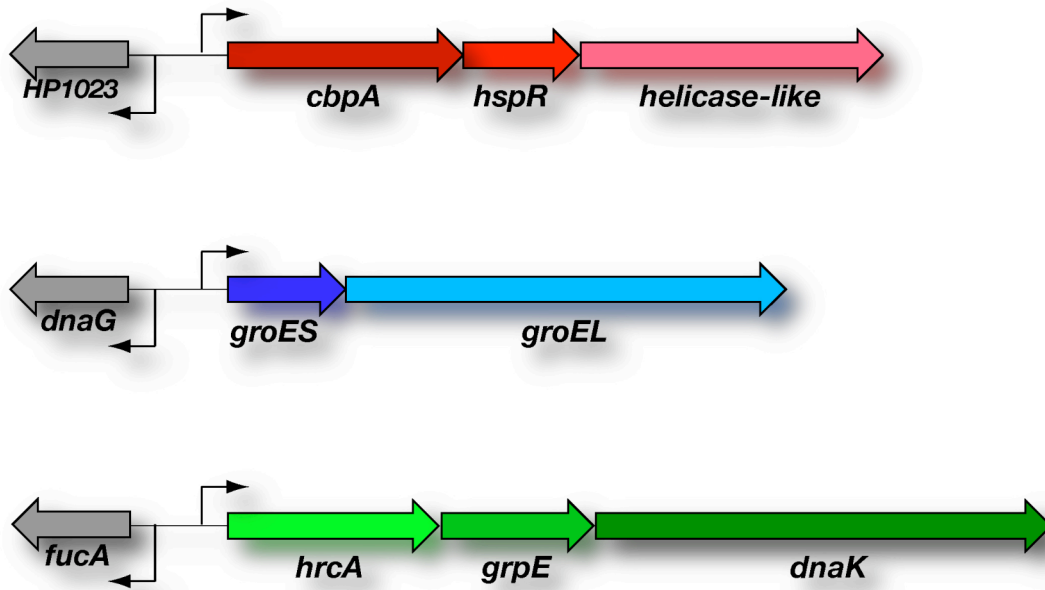


Figura 4. Rappresentazione schematica dei tre operoni multicistronici contenenti i geni codificanti le principali heat shock proteins in *H. pylori* (Tomb et al., 1997). Le frecce indicano le sequenze codificanti, i cui nomi sono indicati in corrispondenza di ciascuna di esse; le frecce ricurve indicano le posizioni dei promotori e le direzioni dei trascritti.

Il secondo gene di questo operone codifica per un regolatore trascrizionale che presenta omologia di sequenza con HspR, un repressore di *Streptomyces coelicolor* coinvolto nella regolazione negativa dei geni heat shock (Bucca et al., 1995). Infine, l'ultimo gene dell'operone codifica per una proteina simile ad una putativa elicasi di *Haemophilus influenzae* (Tomb et al., 1997).

L'operone raffigurato nella parte centrale di Figura 4 contiene il gene codificante per la chaperonina GroEL (Hsp60), preceduto dalla sequenza codificante per la co-chaperonina GroES (Hsp10) (Macchia et al., 1993; Suerbaum et al., 1994).

Infine, nel terzo operone sono contenuti i geni codificanti per una proteina omologa ad un repressore trascrizionale di *Bacillus subtilis*, chiamato HrcA, coinvolto nella repressione dei geni heat shock (Wetzstein et al., 1992), per la proteina GrpE (co-chaperone di DnaJ che media lo scambio ADP+Pi / ATP) e per la chaperonina DnaK. Il gene codificante la principale co-chaperonina di DnaK, DnaJ (locus HP1329), si trova in una posizione separata del genoma, non incluso negli operoni descritti.

Vista l'estrema importanza dei meccanismi di risposta agli stress nella sopravvivenza e persistenza del patogeno nello stomaco dell'ospite, la comprensione e la caratterizzazione dell'heat shock response in *H. pylori* ha suscitato molto interesse nella comunità scientifica; esistono, infatti, in letteratura, numerosi dati riguardo aspetti biochimici ed immunologici di questo gruppo di proteine (Huesca et al., 1996; Macchia et al., 1993; Suerbaum et al., 1994; Yokota et al., 1994). Di pari passo con il sequenziamento dei ceppi di *H. pylori*, oggi disponibili, si è sviluppata anche la ricerca riguardo i meccanismi di regolazione dell'espressione dei geni codificanti le heat shock proteins, oggetto di studio di questo lavoro.

B.5 Regolazione dell'espressione genica in *Helicobacter pylori*

Dall'analisi del genoma di *H. pylori* emerge la relativa scarsità di geni codificanti per proteine con funzione regolatoria se confrontato con altri microrganismi con un genoma di dimensioni paragonabili (Alm et al., 1999; Tomb et al., 1997). Ad esempio, il numero di sistemi a due componenti, importanti nella risposta a variazioni ambientali, è nettamente inferiore in *H. pylori* rispetto ad *E. coli* (Beier and Frank, 2000; Mizuno, 1997; Spohn and Scarlato, 1999a; Tomb et al., 1997); inoltre, in *H. pylori*, si ritrovano meno di un ottavo dei regolatori trovati in *E. coli* e solo un quarto di quelli di *Haemophilus influenzae* (Fleischmann et al., 1995). Queste differenze sono state imputate ad una diversa complessità dello spettro di nicchie colonizzate dalle diverse specie batteriche. *H. pylori* è, infatti, l'unico patogeno in grado di colonizzare lo stomaco umano, quindi l'interazione e la competizione con altri microrganismo è nulla. L'assenza, in *H. pylori*, dei componenti di alcuni importanti sistemi di regolazione può suggerire che questo patogeno abbia sviluppato meccanismi di regolazione differenti da quelli di altri batteri Gram negativi, non ancora ben caratterizzati.

B.5.1 Meccanismi di regolazione trascrizionale

Entrando più nel dettaglio, l'analisi del genoma ha permesso di identificare 32 loci codificanti per proteine con una possibile funzione regolatoria e di questi solo 17 sono stati identificati come regolatori dell'inizio

di trascrizione (Scarlato et al., 2001), rappresentati schematicamente in Figura 5.

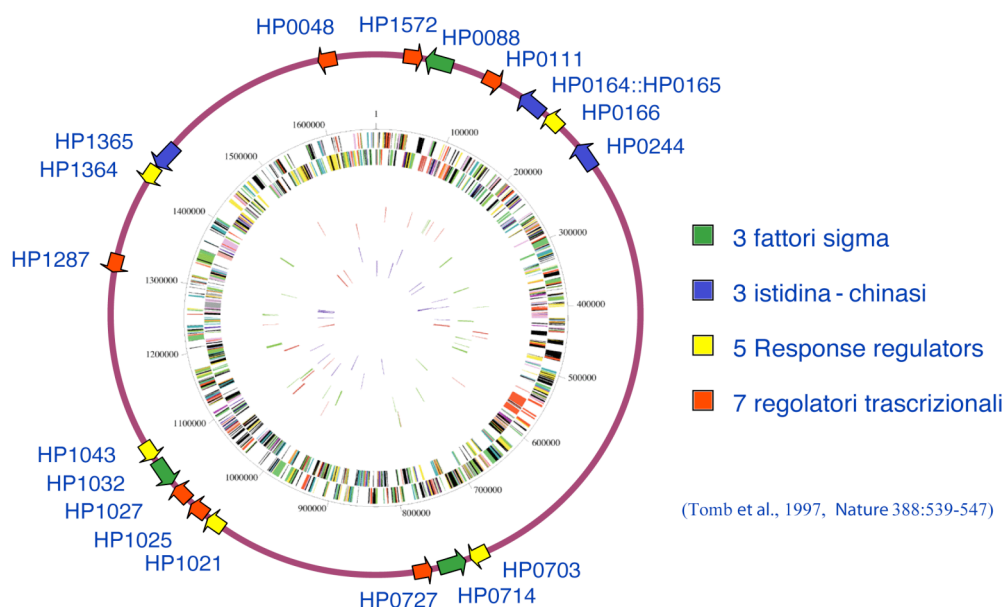


Figura 5. Quadro generale dei regolatori trascrizionali individuati dall'analisi del genoma di *H. pylori*.

B.5.1.1 I fattori sigma

Il fattore sigma vegetativo di *H. pylori*, RpoD, è un polipeptide di 676 amminoacidi con omologia di sequenza con i principali fattori sigma di un certo numero di microrganismi. Vista la somiglianza con il fattore σ^{70} di *E. coli*, inizialmente questo fattore è stato nominato σ^{70} da alcuni autori (Solnick et al., 1997; Tomb et al., 1997), poi chiamato definitivamente σ^{80} in accordo con il suo peso molecolare (Beier et al., 1998).

H. pylori possiede solo due fattori sigma alternativi, nominati σ^{54} (RpoN) e σ^{28} (FliA). Molto interessante risulta essere l'osservazione che entrambi questi fattori sono coinvolti nella regolazione trascrizionale dei geni flagellari; in particolare, l'RNA polimerasi contenente il fattore sigma alternativo σ^{54} è deputato alla trascrizione dei componenti del corpo basale del flagello e dell'uncino (chiamati anche geni flagellari strutturali di classe II), mentre la polimerasi contenente il fattore σ^{28} è ritenuta responsabile della

trascrizione dei geni codificanti i componenti dei filamenti flagellari (chiamati geni di classe III) (Kim et al., 1999; Niehus et al., 2004; Spohn and Scarlato, 1999a; Suerbaum et al., 1993).

B.5.1.2 I sistemi a due componenti

I sistemi a due componenti sono meccanismi di trasduzione del segnale procariotici, molto diffusi tra i microrganismi, che consentono la regolazione di funzioni cellulari in risposta a variazioni delle condizioni ambientali e sono frequentemente coinvolti, in batteri patogeni, nella regolazione di geni di virulenza. Sono composti da una proteina sensore che riceve stimoli ambientali con il suo dominio amminoterminale, e una proteina regolatrice, che stimola la risposta cellulare attraverso il suo dominio C-terminale, solitamente agendo come regolatore trascrizionale. La comunicazione tra la proteina sensore ed il regolatore di risposta avviene attraverso una reazione di fosforilazione tra una istidina conservata nella proteina sensore, che si autofosforila in presenza dello stimolo adeguato, ed un residuo di aspartato presente nel dominio N-terminale del regolatore di risposta coniugato; in seguito alla fosforilazione, si ha una variazione conformazionale del regolatore di risposta con conseguente attivazione del suo dominio carbossiterminale.

H. pylori possiede tre coppie istidina chinasi-regolatore di risposta coniugato (ovvero HPO164/HPO165-HPO166, chiamata anche ArsR-S, sistema coinvolto nella regolazione dell'espressione di geni in seguito a variazioni di pH (Pflock et al., 2006); HPO244-HPO703 nominato FlgR-S, coinvolto nella regolazione di geni codificanti per componenti del flagello (Spohn and Scarlato, 1999a); HP1364-HP1365, rinominate CrdR-S, responsabili della regolazione trascrizionale, dipendente da ioni rame, del gene codificante per CrdA, implicato nella resistenza a questo metallo (Waidner et al., 2005)), più due regolatori di risposta orfani (HP1043 e HP1021). Per questi ultimi due regolatori, fino ad ora, non sono state identificate le istidine-chinasi in grado di agire su queste due proteine: potrebbero essere tra i geni di *H. pylori* con funzione ancora sconosciuta oppure potrebbero rappresentare regolatori di risposta in grado di attivarsi senza alcuna fosforilazione (Beier and Frank, 2000). I targets di regolazione di HP1043 e HP1021 non sono ancora stati

caratterizzati, anche se un recente lavoro suggerisce il coinvolgimento di HP1021 nel metabolismo dell'acetone (Pflock et al., 2007).

B.5.1.3 Altri regolatori trascrizionali

Dall'analisi dei genomi sequenziati è stato identificato un ristretto gruppo di geni codificanti per regolatori trascrizionali con omologhi in altre specie batteriche. Alcuni di questi geni codificano per proteine la cui funzione non è stata ancora caratterizzata: fra questi il gene HP1139 (*soj*), un putativo repressore, omologo del regolatore dei geni per la sporulazione di *B. subtilis*; il gene HP1140 (*birA*), omologo del repressore BirA dell'operone della biotina di *E. coli*; il gene HP1287 (*tenA*), codificante per un putativo attivatore trascrizionale.

Un altro gruppo di geni, invece, codifica per regolatori trascrizionali che sono stati caratterizzati nel corso degli ultimi anni: molto lavoro è stato fatto riguardo il regolatore trascrizionale Fur, omologo al repressore Fur di *E. coli*, codificato dal gene HP1027. In *H. pylori*, Fur è una proteina di 17 kDa molto abbondante, il cui gene, clonato per la prima volta nel 1998 (Bereswill et al., 1998), complementa parzialmente la mutazione del gene *fur* in *E. coli* (Fassbinder et al., 2000). Fur è coinvolto nell'omeostasi del ferro, regolando l'espressione di sistemi per l'acquisizione e per l'accumulo in risposta alla concentrazione di ferro intracellulare. Il gene HP1338 (*nikR*) codifica per una proteina omologa ad un regolatore trascrizionale nickel dipendente di *E. coli* chiamato NikR; per quanto riguarda NikR di *H. pylori*, diversi gruppi stanno cercando di definire i targets molecolari di questo regolatore e le possibili interconnessioni con il circuito di regolazione metallo-dipendente di Fur (Delany et al., 2005; Ernst et al., 2006).

Infine, sono stati identificati i geni HP0111 (*hrcA*) e HP1025 (*hspR*), codificanti per proteine omologhe a repressori trascrizionali coinvolti nella regolazione dei geni heat shock in altri sistemi: questi repressori, oggetto di studio di questo lavoro, verranno descritti dettagliatamente nel paragrafo successivo.

B.6 La regolazione trascrizionale dei geni codificanti le heat shock proteins

Le heat shock proteins sono codificate da geni altamente conservati sia tra gli eucarioti che tra i procarioti, mentre i meccanismi di regolazione dell'espressione di questi geni si sono considerevolmente differenziati tra specie diverse. In particolare, i batteri hanno evoluto complessi circuiti di regolazione trascrizionale dei geni heat shock che assicurano un livello basale di espressione necessario per le funzioni cellulari in condizioni normali di crescita e una forte induzione in seguito ad un aumento improvviso della temperatura.

B.6.1 Strategie di regolazione trascrizionale dei geni heat shock nei procarioti

La regolazione trascrizionale dei geni heat shock può essere di tipo positivo o negativo. Un sistema di regolazione di tipo positivo si basa sull'uso di uno o più fattori sigma alternativi che guidano l'RNA polimerasi sui promotori dei geni heat shock di tipo diverso rispetto ai promotori housekeeping. In alternativa o parallelamente a questo controllo positivo, i batteri possono regolare l'espressione dei geni heat shock in modo negativo, attraverso un meccanismo repressore-dipendente: in questi casi, la trascrizione dei geni heat shock inizia da promotori housekeeping ed elementi in *cis* presenti sul promotore sono associati ad un repressore che limita la trascrizione in condizioni fisiologiche. In seguito a determinati stimoli ambientali si ha il distacco del repressore con conseguente derepressione del promotore.

In *E. coli*, a lungo organismo modello per lo studio della regolazione dei geni heat shock, la trascrizione di circa 30 geni indotti in condizioni di stress termico è sotto il controllo di un fattore sigma alternativo σ^{32} (*rpoH*): in particolare, in seguito a shock termico, si hanno elevati livelli di σ^{32} dovuti ad una aumentata traduzione dell'RNA di *rpoH* e ad una maggior stabilità del fattore σ^{32} stesso (Bukau, 1993). La risposta è ulteriormente controllata a feedback dalle chaperonine DnaK, DnaJ e GrpE, che, agendo in modo sinergico (Georgopoulos, 1992), sequestrano σ^{32} in condizioni fisiologiche

(controllo dell'attività), e lo possono dirigere alla proteina FtsH, una proteasi che lo degrada (controllo della stabilità). In questo sistema di controllo dell'omeostasi del fattore sigma, il punto chiave è che in condizioni di shock termico le proteine denaturate che si accumulano, sequestrano la chaperonina DnaK e le co-chaperonine DnaJ-GrpE, lasciando il fattore σ^{32} stabile ed attivo (Gross, 1996). Un secondo regulone heat shock in *E. coli* è controllato dal fattore sigma alternativo σ^E , che appartiene ad una classe di fattori sigma che rispondono a stimoli extracellulari, quali ad esempio proteine denaturate nel periplasma; anche in questo caso l'espressione e l'attività di σ^E è sotto il controllo di un complesso sistema di regolazione (Missiakas et al., 1997; Missiakas and Raina, 1997). Infine, un terzo gruppo di geni correlati all'heat shock è sotto il controllo di σ^{54} , attivato dalla proteina PspF (Model et al., 1997).

Altre specie batteriche hanno evoluto sistemi di regolazione complessi, in cui si ha l'integrazione di meccanismi positivi e negativi di controllo della trascrizione. Un esempio in tal senso si ritrova in *B. subtilis*, microrganismo diffusamente studiato che rappresenta un modello di studio tra i batteri Gram positivi. In *B. subtilis* esistono diverse classi in cui possono essere classificati i geni indotti in seguito a shock termico: in particolare, i geni codificanti le principali heat shock proteins sono raggruppati in tre distinte classi, regolate a livello trascrizionale, in modo diverso l'una dall'altra (Hecker et al., 1996). Mentre i geni appartenenti ad una di queste classi (Classe II, tra i quali *gspA*, *csbA*, *katE* ed altri) sono regolati positivamente da un fattore sigma alternativo specifico σ^B (Haldenwang, 1995), quelli appartenenti alle altre due classi (Classe I e Classe III) sono regolati negativamente in modo repressore dipendente. I geni di classe III, che codificano per proteasi Clp e per altre due proteine regolatrici (McsA e McsB), sono organizzati in tre operoni distinti e il loro controllo trascrizionale avviene tramite il repressore CtsR, anche se la comprensione di questo meccanismo non è ancora completa (Schumann, 2003). I nove geni appartenenti alla Classe I, codificanti le principali chaperonine quali GrpE, DnaK, DnaJ, GroES e GroEL, sono organizzati in due operoni distinti: in condizioni fisiologiche, la trascrizione di questi geni è regolata negativamente dal repressore trascrizionale HrcA (Schulz and Schumann, 1996) che interagisce con una sequenza ripetuta invertita

chiamata CIRCE (acronimo di controlling inverted repeat of chaperone expression) (Zuber and Schumann, 1994), presente a livello dei promotori a monte dei due operoni; in condizioni di stress, si ha il distacco del regolatore e la derepressione di questo gruppo di geni. HrcA è il repressore dei geni heat shock più diffuso nel mondo procariotico, ed infatti la coppia operatore/repressore CIRCE/HrcA è stata riscontrata in più di 40 specie batteriche, inclusi proteobatteri e cianobatteri (Narberhaus, 1999).

Una variante di questo meccanismo di repressione, meno diffuso tra i batteri rispetto alla coppia repressore/operatore HrcA/CIRCE, è stata identificata in *Streptomyces coelicolor*. In questo microrganismo, la trascrizione dell'operone contenente *dnaK* è regolata negativamente dal repressore chiamato HspR (Heat shock protein Repressor) (Bucca et al., 1995; Grandvalet et al., 1997), che, in condizioni fisiologiche, lega tre sequenze ripetute invertite, presenti nel promotore del gene, rinominate HAIR (HspR associated inverted repeat) (Grandvalet et al., 1999), reprimendo in tal modo la trascrizione.

B.6.2 La regolazione trascrizionale dei geni heat shock in *Helicobacter pylori*

Lo studio della regolazione trascrizionale dei geni heat shock di *H. pylori* ha ricevuto un impulso positivo con il sequenziamento del genoma di questo microrganismo. Come descritto precedentemente, i geni codificanti le principali heat shock proteins sono organizzati in tre operoni distinti: i relativi promotori sono stati nominati *Pgro*, *Phrc* e *Pcbp*, rispettivamente per gli operoni *groES-groEL*, *hrcA-grpE-dnaK* e *cbpA-hspR-helicase like*. Per verificare la risposta trascrizionale di questo gruppo di geni in seguito a shock termico, Spohn e Scarlato (Spohn and Scarlato, 1999b) hanno eseguito un'analisi dei livelli di trascritto di questi operoni in condizioni di shock termico: in Figura 6 sono riportati i saggi di primer extension, eseguiti su campioni di RNA estratti da cellule di *H. pylori* G27 wild type in tempi successivi allo stimolo, e retrotrascritti con primers specifici per i tre promotori *Pgro*, *Phrc*, *Pcbp*.

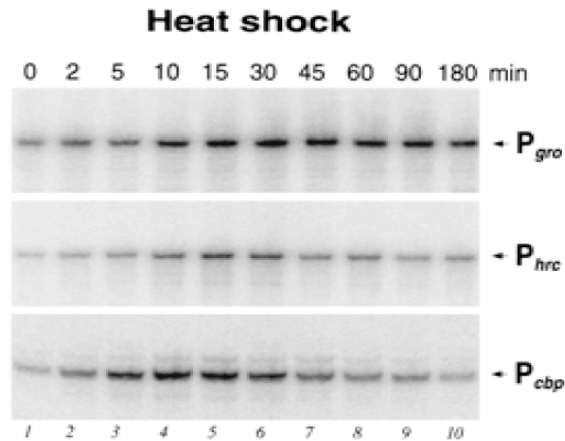


Figura 6. Analisi della variazione dei livelli di trascritto dei tre operoni in seguito a shock termico attraverso saggi di primer extension (*Pgro* e *Phrc*) o di S1 mapping (*Pcbp*). L'RNA analizzato è stato estratto da cellule di *H. pylori* cresciute a 37°C (non esposta a shock termico, corsia 1) oppure in seguito a shock termico (42°C) (corsie 2-10). Gli intervalli di tempo ai quali l'RNA è stato estratto sono indicati, in minuti, sopra ciascuna corsia. I prodotti di estensione sono indicati sulla destra (Spohn et al., 2002).

Come si può vedere, i livelli di trascritto, per tutti e tre gli operoni analizzati, aumentano in seguito a shock termico, per poi riabbassarsi a livello basale dopo un certo intervallo di tempo.

L'analisi della sequenza nucleotidica dei tre promotori, eseguita dopo aver identificato il sito d'inizio della trascrizione per tutti gli operoni, ha rivelato la presenza di esameri -10 con alta omologia (al massimo 1 mismatch) con la sequenza consensus -10 riconosciuta dall'RNA polimerasi contenente il fattore sigma vegetativo σ^{70} in *E. coli*; è stato possibile individuare anche esameri -35 ben conservati (Spohn and Scarlato, 1999b). Queste osservazioni, unite all'assenza, nel genoma di *H. pylori*, dell'omologo del fattore sigma per l'heat shock di *E. coli* σ^{32} , hanno fatto ipotizzare che i principali geni chaperone fossero trascritti dall'RNA polimerasi contenente il fattore sigma vegetativo di *H. pylori*, σ^{80} . Esperimenti di trascrizione *in vitro* sul promotore *Pgro* eseguiti con l'RNA polimerasi di *E. coli* purificata e con una RNA polimerasi ibrida contenente le subunità α e β di *E. coli* e la subunità σ^{80} di *H. pylori* hanno permesso di identificare lo stesso sito d'inizio della trascrizione, già precedentemente mappato *in vivo* (Spohn and Scarlato, 1999b), confermando in tal modo l'ipotesi di partenza.

Come già descritto precedentemente, nel genoma di *H. pylori* sono presenti geni codificanti per gli omologhi dei repressori HrcA e HspR, rispettivamente di *B. subtilis* e *S. coelicolor*. Per verificare un possibile ruolo svolto da questi due repressori nel controllo della trascrizione dei tre operoni heat shock, sono stati eseguiti esperimenti di primer extension, retrotrascrivendo, con primers specifici per i promotori dei tre operoni, campioni di RNA estratti dal ceppo G27 wild type, dai ceppi mutanti $\Delta hrcA$, $\Delta hspR$ e dal ceppo doppio mutante $\Delta hrcA-\Delta hspR$ (Spohn et al., 2004).

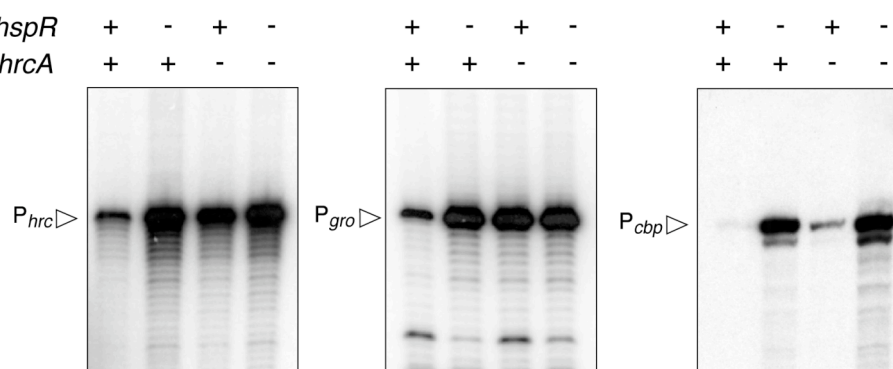


Figura 7. Saggi di primer extension sui promotori *Phrc*, *Pgro* e *Pcbp*. I diversi ceppi di *H. pylori* da cui è stato estratto l'RNA analizzato, sono indicati nella parte alta della figura. I prodotti di estensione sono indicati dalle frecce (Spohn et al., 2004).

Come si osserva dalle autoradiografie riportate in Figura 7, i promotori *Pgro* e *Phrc* risultano essere derepressi in tutti i ceppi mutanti, mentre la trascrizione dell'operone controllato da *Pcbp* è influenzata solamente dalla mutazione di *hspR*. Da questo esperimento si desume che il regolatore HspR, da solo, è in grado di reprimere la trascrizione del proprio operone, mentre entrambi i repressori HrcA e HspR sono necessari per reprimere gli operoni *groES-groEL* e *hrcA-grpE-dnaK*.

Per verificare un eventuale coinvolgimento diretto dei due repressori a livello dei promotori regolati, sono stati eseguiti saggi di legame al DNA. Il repressore HspR è una proteina solubile e facilmente purificabile: è stato possibile, quindi, eseguire esperimenti di footprinting con DNasi I e mappare i siti di legame sui tre promotori. In particolare, sul promotore *Pcbp*, HspR lega in corrispondenza del sito d'inizio della trascrizione (dalla posizione -59 alla

+14, rispetto al sito d'inizio della trascrizione), mentre sui promotori *Pgro* e *Phrc*, il legame di HspR avviene ampiamente a monte dell'inizio di trascrizione (tra -118 e -46 su *Pgro* e tra -78 e -156 su *Phrc*) (Spohn and Scarlato, 1999b). Per quanto riguarda HrcA, esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina hanno dimostrato il legame di tale repressore ai promotori *Pgro* e *Phrc*, indicando anche in questo caso un intervento diretto del regolatore nel controllo trascrizionale dei due operoni. In questo caso, però, non è stato possibile determinare i siti di legame di HrcA a causa delle difficoltà incontrate nell'ottenere la proteina ricombinante purificata, fatto documentato anche per omologhi di HrcA in altri sistemi. Fino ad oggi, infatti, solo in pochi casi è stato possibile effettuare saggi biochimici *in vitro* con la proteina HrcA (Minder et al., 2000; Susin et al., 2004; Wilson and Tan, 2002). In molti casi l'overespressione di HrcA in *E. coli* è risultata problematica, in quanto la proteina mostrava una forte tendenza a formare aggregati e corpi d'inclusione. Diverse strategie sono state messe a punto per ovviare a questo problema. Per esempio, Rieschl e collaboratori (Reischl et al., 2002) hanno sviluppato un metodo per isolare alleli mutanti di HrcA di *B. subtilis*; uno di questi mutanti, contenente 5 sostituzioni amminoacidiche, è risultato maggiormente solubile quando overespresso in *E. coli*, ed è stato così possibile procedere con la purificazione e con saggi *in vitro*. Una forma ricombinante di HrcA di *Bacillus thermoglucosidasius* è stata purificata da cellule di *E. coli* in condizioni denaturanti e successivamente rinaturata in una conformazione attiva, dializzandola in presenza di DNA plasmidico contenente la sequenza contattata *in vivo* dalla proteina (Watanabe et al., 2001).

Lo scopo principale del presente lavoro è stato quello di caratterizzare ulteriormente il meccanismo di regolazione dei geni heat shock in *H. pylori*. Inizialmente è stata analizzata la sequenza amminoacidica del regolatore HrcA ed è stata confermata sperimentalmente la predizione bioinformatica di una sua associazione con la membrana interna. Successivamente sono state risolte le problematiche riguardanti l'espressione di HrcA ricombinante in *E. coli* e la successiva purificazione; una volta ottenuta la proteina ricombinante è stato possibile definire i siti di legame di HrcA sui promotori da essa contattati.

E' noto, inoltre, che, in alcuni microrganismi, fra i quali il meglio caratterizzato è *B. subtilis*, la chaperonina GroEL può prendere parte alla regolazione dei geni heat shock: in particolare, l'attività del repressore HrcA di *B. subtilis* è modulata positivamente dalla chaperonina GroE. A riguardo, è stato proposto un modello in cui la chaperonina GroE, in condizioni fisiologiche, interagisce con HrcA e la rende in grado di legare i promotori dei geni di classe I, e quindi di reprimere la trascrizione; in condizioni di shock termico, GroE verrebbe sequestrata dall'accumulo di proteine denaturate, ed HrcA, in queste condizioni, non sarebbe più in grado di legare il DNA e reprimere la trascrizione (Mogk et al., 1997). In questo lavoro è stata verificata la possibilità di un coinvolgimento di GroE nella modulazione dell'attività di HrcA e di HspR: in particolare, alcuni dati presentati in questa tesi suggeriscono un doppio ruolo della chaperonina GroESL, sia come chaperone sia come modulatore della risposta heat shock.

Infine, nell'ultima parte del lavoro, attraverso l'utilizzo di macroarrays, sono stati analizzati i profili di espressione genica su scala genomica in risposta alla inattivazione dei regolatori heat shock HrcA e HspR. Da questa analisi emerge un interessante interconnessione tra la regolazione della risposta heat shock e la motilità, fattore di virulenza di estrema importanza per la patogenesi di *H. pylori*.

C. Risultati

C.1 Studio della localizzazione di HrcA in *H. pylori*

In questa prima parte del lavoro, prendendo spunto da informazioni derivanti da analisi bioinformatiche, si è voluta investigare la localizzazione subcellulare del regolatore trascrizionale HrcA di *H. pylori*.

C.1.1 Analisi bioinformatica del regolatore HrcA

L'analisi della sequenza amminoacidica di HrcA di *H.pylori* ha permesso di individuare una porzione centrale altamente idrofobica che potrebbe costituire un dominio transmembrana. Si è pervenuti a tale conclusione sottoponendo la sequenza primaria della proteina all'analisi di software dedicati alla predizione di regioni transmembrana. In particolare, è stato utilizzato il software TMPred, che fornisce, oltre alla predizione su possibili domini transmembrana, anche informazioni sul loro possibile orientamento all'interno della cellula. In Figura 8 è mostrato il grafico di predizione, con indicate in ascissa la posizione amminoacidica ed in ordinata un 'prediction score' (derivante da varie matrici pesate).

TMPred output for HrcA (HP0111)

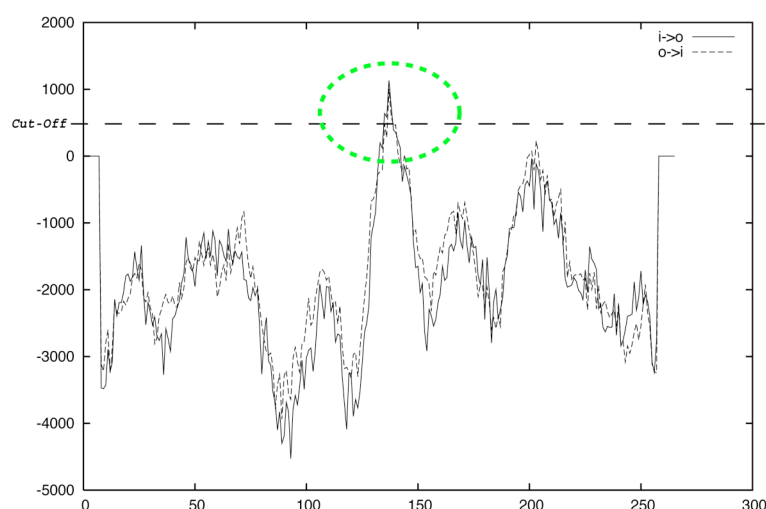


Figura 8. Grafico fornito dal software TMPred per HrcA. La posizione amminoacidica è riportata sull'asse delle ascisse, mentre in ordinata è riportato un 'prediction score'. Il valore di cut-off, impostato dal programma, è riportato come una linea tratteggiata. Il picco centrale, corrispondente alla putativa regione transmembrana, è evidenziata in verde.

Come si può osservare dal grafico, l'analisi suggerisce un possibile dominio transmembrana composto da 17 amminoacidi (dal residuo 130 al 146), identificato dal picco centrale (evidenziato, in figura, dalla linea tratteggiata verde). Inoltre, la regione N-terminale sarebbe rivolta all'interno della cellula, mentre la porzione C-terminale sarebbe confinata nel periplasma.

Mediante l'utilizzo del software HNN (Hierarchical Neural Network), creato per la predizione della struttura secondaria di proteine, è possibile individuare un putativo dominio di legame al DNA del tipo elica-giro-elica nella porzione N-terminale di HrcA, più precisamente tra i residui 14 e 58.

In Figura 9 è mostrata la sequenza amminoacidica di HrcA di *H. pylori*, insieme alle sue principali caratteristiche: l'ipotetico dominio di legame al DNA è evidenziato in verde in figura, mentre il dominio idrofobico è indicato in azzurro) (Spohn et al., 2004).

```

MLRRIKVGSNLNK KESLLDAFVKTYLQILEPISS KRLKELADLKISCATIRNYFOILSKE      60
GMLYQAHSSGARLPTFKAFENYWQKSLRFETLKVNEKRLKSASENFGLFTLLKKPSLERL      120
ERVIECEKR FLILDFLAFSCALGYSVKMEKFLELVGRSVKEVRSIAASFNALSARQLE      180
RLEYSNTQITRFNLMGLKTLNLSPLFFDILGGKVLRLSKGLHFIEPDCMLVTRPVEFQN      240
KRMQLLCVKGKLECDYEGFFQTISEEE                                          266

```


Figura 9. Sequenza amminoacidica della proteina HrcA di *H. pylori* (HP0111) (Tomb et al., 1997). Un putativo dominio di legame al DNA (residui 14-58) ed una regione transmembrana di 17 amminoacidi (residui 130-146) sono evidenziati, rispettivamente, in verde ed in azzurro. L'analisi di sequenza è stata eseguita utilizzando i softwares HNN e TMpred (disponibili al sito <http://www.expasy.ch/tools/>).

Da questa analisi possiamo, quindi, ipotizzare un'associazione di HrcA con la membrana interna.

C.1.2 Associazione di HrcA con la membrana interna in *H. pylori*

Al fine di ottenere evidenze sperimentali dell'associazione del repressore HrcA con la membrana interna, abbiamo purificato la frazione contenente la membrana interna di *H. pylori*, saggiandola in Western Blot per la presenza di HrcA. Per fare ciò si è costruito un ceppo pseudo-wild-type di *H. pylori*, in grado di esprimere la proteina di fusione HrcA-HA: in particolare, il mutante di delezione per il gene *hrcA* è stato complementato con una copia del gene *hrcA* fuso al 3' con la sequenza nucleotidica codificante per l'epitopo HA (Tabella 1). Conseguentemente, è stato possibile rilevare la presenza di HrcA nelle diverse frazioni di *H. pylori* utilizzando l'antisiero, disponibile sul mercato, diretto contro la tag HA. Come rappresentato schematicamente in Figura 3, una copia del gene *hrcA*, contenente il promotore endogeno *Phrc*, fusa all'estremità 3' alla sequenza nucleotidica codificante la tag HA, è stata introdotta, assieme ad una cassetta per la resistenza al cloramfenicolo, attraverso ricombinazione omologa, all'interno del locus *vacA* nel ceppo mutante G27(*hrcA::km*). Diversi trasformanti sono stati, quindi, isolati e la corretta inserzione della sequenza *Phrc-hrcA-HA* è stata verificata attraverso Southern blotting (dato non mostrato); uno dei cloni risultati positivi, rinominato G27(*hrcA-HA*) (Tabella 1) è stato selezionato per successivi esperimenti. Innanzitutto, la positiva complementazione è stata verificata saggiando la capacità del ceppo ingegnerizzato di recuperare la risposta heat-shock: in particolare, un esperimento di primer extension a livello del promotore dell'operone *groES-groEL* ha confermato l'avvenuta complementazione (dato non mostrato). Successivamente, è stata isolata la frazione contenente la membrana interna dal suddetto ceppo esprimente

HrcA-HA attraverso ultracentrifugazione su gradiente di saccarosio, così come descritto in ‘Metodi’.

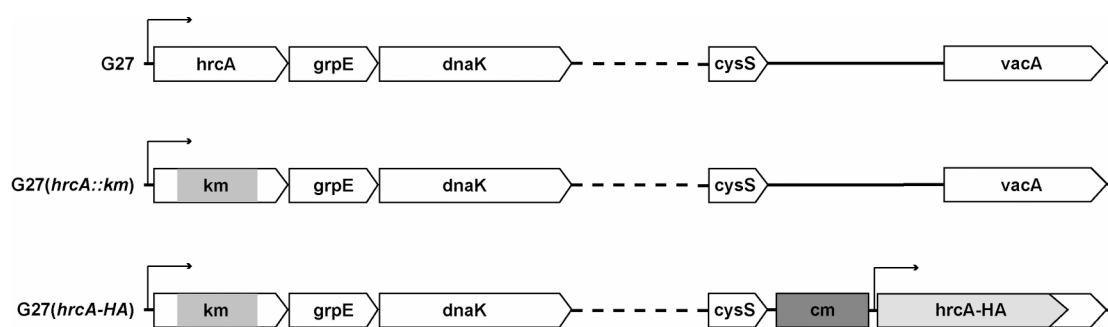


Figura 10. Rappresentazione schematica dell’operone *hrcA-grpE-dnaK* e del locus *vacA* nei diversi ceppi, indicati sulla sinistra. Le frecce indicano le ORFs. Le cassette per la resistenza alla kanamicina (*km*) e cloramfenicolo (*cm*) sono riportate, rispettivamente, in grigio chiaro e grigio scuro.

Quantità crescenti di estratto di membrana interna del ceppo *G27(hrcA-HA)* sono state caricate su SDS-PAGE assieme ad estratti proteici totali dei ceppi *G27* wild-type e *G27(hrcA-HA)*: le proteine, così separate, sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa la quale è stata incubata con l’anticorpo policlonale anti-HA tag (sc-805, Santa Cruz Biotech Inc.); il risultato finale del Western blot è mostrato in Figura 11a. Si può notare dalla figura la presenza di una banda all’altezza del peso molecolare atteso per la proteina di fusione HrcA-HA (33 kDa) nell’estratto totale del ceppo *G27(hrcA-HA)* (corsia 2) e nelle corsie caricate con quantità crescenti di estratto di membrana interna (corsie 3-6). Come atteso, tale banda risulta essere assente nell’estratto totale del ceppo *G27* wild-type (corsia 1).

Per escludere la possibilità di una contaminazione della preparazione contenente la membrana interna con proteine citoplasmatiche, lo stesso filtro è stato incubato con un anticorpo diretto contro NikR, regolatore trascrizionale di *H. pylori* con localizzazione citoplasmatica. Come mostrato in Figura 11b, è chiaramente visibile una banda all’altezza del peso molecolare atteso per NikR (15 kDa) in entrambi gli estratti proteici totali (corsie 1 e 2), mentre tale banda è totalmente assente nei campioni corrispondenti agli estratti di membrana (corsie 3-6). Il risultato di questo secondo Western blot

suggerisce che la preparazione di membrane interne utilizzata non presenta contaminazioni da proteine citoplasmatiche.

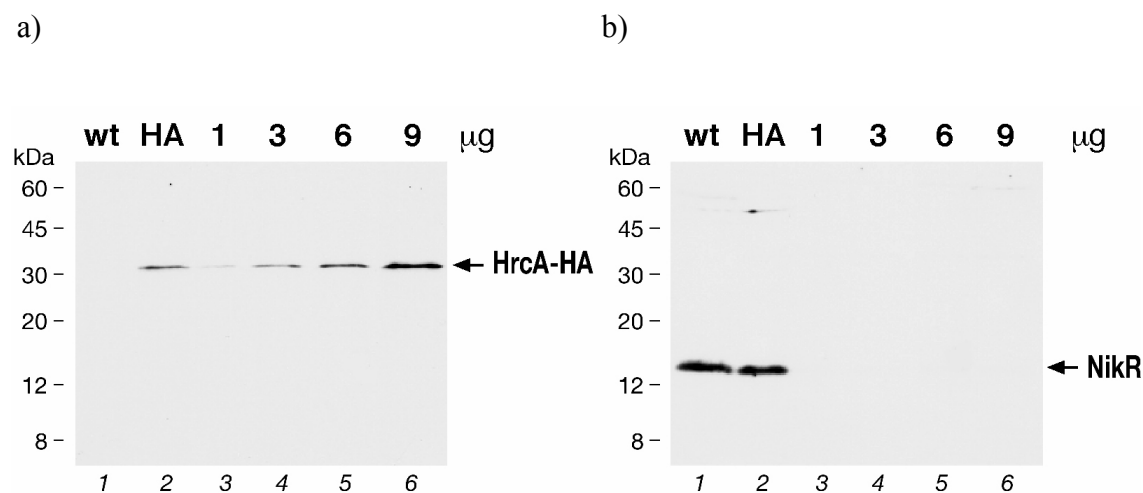


Figura 11. (a) Western blot sulla frazione di membrana eseguito con l'anticorpo policlonale anti-HA tag. Quantità crescenti di preparazione di membrana interna del ceppo di *H. pylori* G27(*hrcA-HA*) (3, 9, 18, 29 μ g rispettivamente dalla corsia 3 alla 6) sono state separate attraverso elettroforesi su gel al 15% (SDS-PAGE), assieme a estratti proteici totali dei ceppi di *H. pylori* G27 wild-type (corsia 1) e G27(*hrcA-HA*) (corsia 2). Sulla sinistra sono riportate le posizioni degli standard di peso molecolare. La banda corrispondente alla proteina di fusione HrcA-HA è indicata dalla freccia sulla destra del gel. Corsie: wt, ceppo G27 wild-type; HA, ceppo esprime la proteina di fusione HA-HrcA.(b) Western blot eseguito sullo stesso filtro mostrato in (a), ibridato con l'anticorpo anti-NikR. La banda corrispondente alla proteina NikR è indicata dalla freccia sulla sinistra del gel.

Pur non potendo escludere la possibilità che HrcA formi complessi ad alto peso molecolare che co-sedimentano con la frazione di membrana, l'esperimento sopra descritto sembra indicare che il repressore HrcA di *H. pylori* è associato alla membrana interna della cellula, confermando così le indicazioni emerse dall'analisi bioinformatica.

C.2 Studio del meccanismo di repressione dei promotori 'heat-shock'

In questa parte del lavoro, si è cercato di definire il particolare meccanismo di repressione, svolto da entrambi i repressori HrcA e HspR a livello dei due promotori heat-shock co-regolati (*Pgro* e *Phrc*).

C.2.1 Overespressione di HrcA in *Escherichia coli*

Con l'intento di eseguire saggi *in vitro* con la proteina HrcA ricombinante, al fine di definire i siti di legame di tale regolatore a livello dei promotori contattati, si è tentato di overesprimere tale repressore in cellule di *E. coli* BL21 (DE3). In particolare, la sequenza codificante HrcA è stata clonata in quattro differenti vettori di espressione. I trasformanti sono stati cresciuti a diverse temperature e l'espressione della proteina è stata indotta tramite IPTG e verificata attraverso SDS-PAGE, confrontando estratti proteici totali preparati da campioni collezionati prima e dopo l'induzione. Più precisamente, il gene *hrcA* è stato clonato nei vettori pTrcA e pET22b, in modo da fondere una coda di sei istidine (His tag) rispettivamente all'estremità ammino- o carbossi-terminale della proteina d'interesse (rappresentate schematicamente in Figura 12a e 12c), e nel vettore pT7-7 per poter esprimere HrcA senza alcuna tag (Figura 12b).

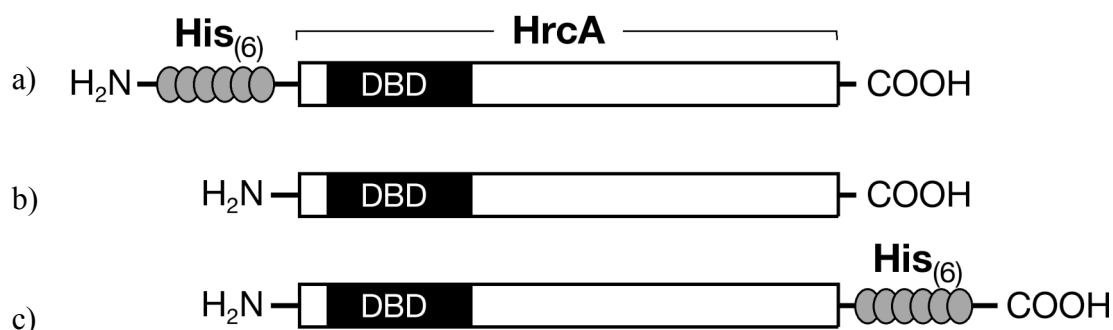


Figura 12. Rappresentazione schematica delle proteine HrcA ricombinanti di cui è stata tentata l'espressione in *E. coli* (a-c). In ciascuno schema (a-c), sono indicate la sequenza codificante la proteina HrcA (rettangolo), assieme al dominio di legame al DNA (DBD) e alle tags fuse (His₆).

Come chiaramente risulta dalla Figura 13a, tutti i campioni proteici estratti dalle cellule che avrebbero dovuto esprimere, a 37°C, le proteine ricombinanti His-HrcA, HrcA o HrcA-His, mostrano un pattern proteico molto simile prima e dopo l'induzione, senza che emergano bande indotte da IPTG (corsie 1, 3 e 5), suggerendo un mancato accumulo di proteina ricombinante all'interno della cellula. Risultati del tutto analoghi sono stati ottenuti sia abbassando la temperatura di crescita a 27°C, sia diminuendo la quantità di IPTG fino a 0.2 mM, sia applicando simultaneamente entrambe le condizioni (dati non mostrati).

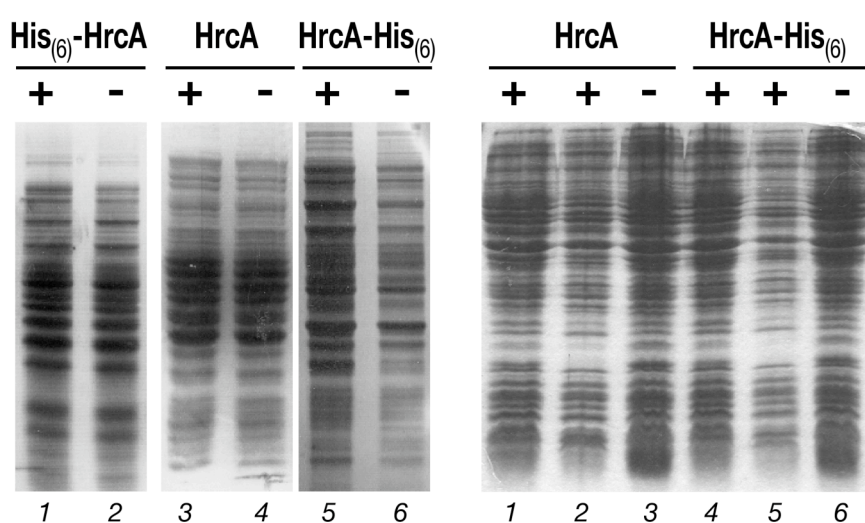


Figura 13. (a) SDS-PAGE con cui sono stati analizzati gli estratti proteici totali di *E. coli* BL21 trasformati con i plasmidi pTrcA-HrcA (corsie 1 e 2, indicate con 'His₍₆₎-HrcA'), pT7-7-HrcA (corsie 3 e 4, indicate con 'HrcA') e pET22b-HrcA (corsie 5 e 6, indicate con 'HrcA-His₍₆₎'). Legenda: +, estratto proteico totale da cellule indotte con 1 mM IPTG a 37°C per 4 ore; -, estratto proteico da cellule non-indotte. (b) SDS-PAGE con cui sono stati analizzati gli estratti proteici totali di *E. coli* BL21 trasformati con i plasmidi pT7-7-HrcA e pHSS6-Phrc (corsie 1, 2, 3), e di *E. coli* BL21 trasformati con i plasmidi pET22b-HrcA e pHSS6-Phrc (corsie 4, 5, 6). Legenda: +, estratto proteico totale da cellule indotte con 0.2 mM IPTG a 27°C per 4 ore (corsie 1, 4) o 16 ore (corsie 2, 5); -, estratto proteico totale da cellule non-indotte.

Inoltre, in seguito ad incubazione con IPTG, si è osservato un parziale schiarimento della coltura, probabilmente dovuto a lisi cellulare: tale fenomeno suggeriva un possibile effetto citotossico dell'induzione di HrcA, dovuto all'accumulo di proteine non correttamente ripiegate e/o all'associazione della proteina ricombinante con la membrana di *E. coli*. L'osservazione in letteratura che il corretto ripiegamento di HrcA di *Bacillus*

thermoglucoasidasi era stato ottenuto dializzando la proteina in presenza di DNA contenente la sequenza contattata *in vivo* dalla proteina (Watanabe et al., 2001), ci ha spinti a tentare l'espressione di HrcA e HrcA-His in cellule di *E. coli* contenenti, oltre al vettore d'espressione appropriato, anche un plasmide ad alto numero di copie recante il promotore dell'operone *hrcA-grpE-dnaK*, noto target diretto di HrcA *in vivo* (Spohn et al., 2004). Anche in questo caso, comunque, campioni raccolti 4 e 16 ore dopo l'aggiunta di IPTG hanno evidenziato la mancata induzione dell'espressione di HrcA (Figura 13b), ed anche in questo caso era visibile lisi cellulare.

Si è tentato di esprimere HrcA anche come proteina di fusione GST-HrcA (Figura 14): in particolare, la sequenza codificante HrcA è stata clonata all'interno del vettore d'espressione pGEX 5X-1 (Tabella 3).



Figura 14. Rappresentazione schematica della proteina ricombinante GST-HrcA. In particolare sono indicate la sequenza codificante per HrcA (rettangolo), con il relativo dominio di legame al DNA, e la GST tag fusa all'estremità N-terminale.

La Figura 15 mostra l' SDS-PAGE di controllo dell'induzione: risulta chiaramente evidente la presenza di una banda all'altezza del peso molecolare atteso per la proteina di fusione GST-HrcA (59kDa) nel campione derivante da cellule indotte con IPTG 0.4 mM per 16 ore a 30 °C (corsia 1), assente nella corsia relativa a cellule di controllo (corsia 2). Sfortunatamente, la proteina di fusione GST-HrcA è risultata essere totalmente insolubile ed ogni tentativo di incrementarne la solubilità abbassando la temperatura di crescita e/o la concentrazione di IPTG è risultato vano.

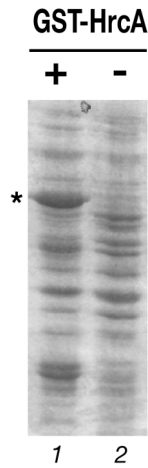


Figura 15. SDS-PAGE in cui sono stati caricati estratti proteici totali di cellule di *E. coli* BL21 contenenti il vettore d'espressione pGEX-HrcA (corsia 1: batteri indotti; corsia 2: batteri non indotti). L'asterisco, posto sulla sinistra del gel, indica la banda corrispondente alla proteina di fusione GST-HrcA.

Infine, abbiamo ipotizzato che le proteine chaperone, massimamente indotte in condizioni di stress ambientale, avrebbero potuto contribuire positivamente all'espressione, al corretto ripiegamento e solubilità di HrcA. Per verificare la fondatezza di tali ipotesi è stato messo a punto un nuovo protocollo di induzione: più nel dettaglio, il ceppo di cellule *E. coli* BL21 (DE3) trasformato con il vettore d'espressione pTrcA-HrcA è stato cresciuto inizialmente a 37°C, quindi la temperatura è stata incrementata fino a 42°C per 90 minuti in modo tale da indurre l'espressione delle proteine chaperone, e successivamente l'espressione di His-HrcA è stata indotta tramite l'aggiunta di IPTG alla concentrazione 1 mM per 4 ore. Come è possibile osservare nell'SDS-PAGE di Figura 16a, in queste condizioni è visibile una banda all'altezza del peso molecolare atteso per His-HrcA (33kDa) nell'estratto proteico totale delle cellule indotte (corsia 1), assente nel campione di controllo (corsia 2).

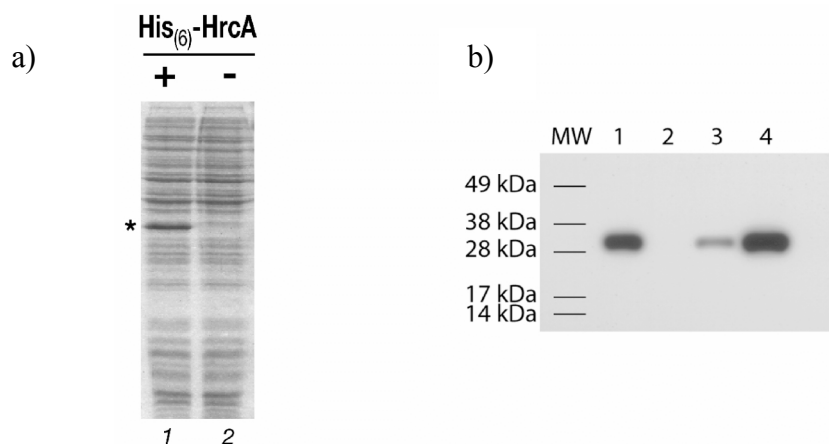


Figura 16. (a) SDS-PAGE di controllo dell'induzione di His-HrcA con 1 mM IPTG a 42°C. Estratti proteici totali da batteri indotti (corsia 1) e non indotti (corsia 2) di cellule di *E. coli* BL21 (DE3) – pTrcA-HrcA. La banda corrispondente alla proteina ricombinante His-HrcA è indicata dall'asterisco posto sulla sinistra del gel. (b) Western blot per testare la solubilità della proteina His-HrcA indotta, eseguito utilizzando l'anticorpo diretto contro la coda di istidine. Simboli: 1: estratto proteico totale da cellule indotte di *E. coli* BL21 (DE3) – pTrcA-HrcA; 2: estratto proteico totale da cellule di controllo non indotte di *E. coli* BL21 (DE3) – pTrcA-HrcA. 3: frazione insolubile di cellule indotte; 4: frazione solubile di cellule indotte. Sulla sinistra sono riportate le posizioni degli standards di peso molecolare (MW).

Inoltre, il Western blot, in Figura 16b, eseguito sulle frazioni di proteine solubili ed insolubili, ibridato con un anticorpo diretto contro la coda di istidine, indica che la maggior parte (all'incirca il 90%) della proteina ricombinante si ripartisce nella frazione solubile: questo ci ha consentito di procedere con la purificazione His-HrcA in condizioni native.

C.2.2 Purificazione di His-HrcA

Inizialmente, abbiamo purificato His-HrcA tramite cromatografia di affinità in condizioni non denaturanti seguendo un protocollo di purificazione standard ('Metodi'), utilizzando come materiale di partenza una coltura da 1 litro di cellule di *E. coli* BL21 (DE3) – pTrcA-HrcA indotte a 42°C come descritto sopra. In Figura 17a sono mostrati i 4 eluati di questa purificazione. Come si può valutare dalla presenza di numerose bande, la proteina d'interesse risulta essere solo parzialmente pura. Per tentare di ridurre il legame aspecifico alla colonna di proteine contaminanti e, di conseguenza, per migliorare il grado di purezza di HrcA, si è deciso di utilizzare il detergente Triton X-100 che, come altri detergenti, potrebbe contribuire a ridurre il legame aspecifico alla matrice dovuto a interazioni idrofobiche o ioniche, il legame di proteine di membrana ad HrcA, e/o il legame di chaperones ad HrcA. In particolare, è stato aggiunto Triton X-100 alla frazione solubile alla concentrazione finale 0.05%, prima di aggiungere la matrice Ni-NTA. I quattro eluati, derivanti da questa purificazione sono mostrati in Figura 17b. In queste condizioni si è ottenuta una proteina His-HrcA con un grado di purezza di circa il 90% ed una resa di 1 mg per litro di coltura indotta.

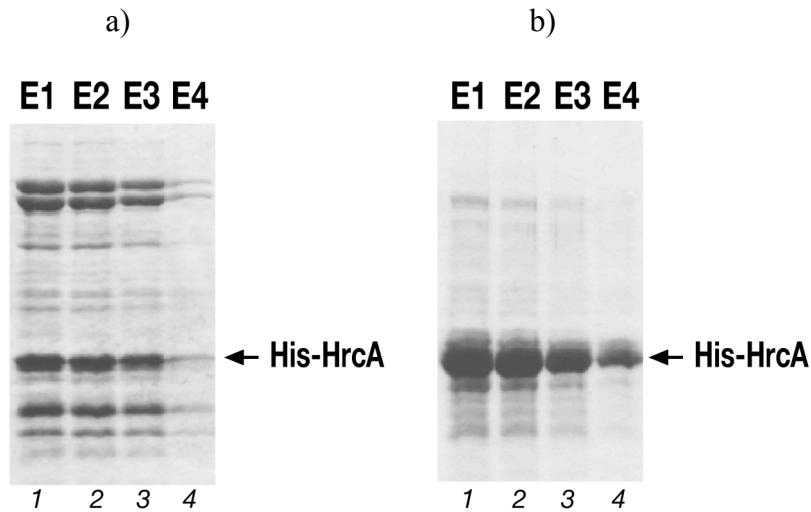


Figura 17. Purificazione tramite cromatografia di affinità della proteina ricombinante His-HrcA. (a) Analisi tramite SDS-PAGE dei quattro eluati (E1-E4, corsie 1-4) ottenuti dalla purificazione tramite cromatografia di affinità su colonna Ni^{2+} -NTA eseguita seguendo un protocollo standard. La banda corrispondente alla proteina ricombinante His-HrcA è indicata dalla freccia sulla destra del gel. (b) Analisi tramite SDS-PAGE dei quattro eluati (E1-E4, corsie 1-4) ottenuti dalla purificazione tramite cromatografia di affinità su colonna Ni^{2+} -NTA eseguita aggiungendo 0.05% Triton X-100 nel lysis buffer.

Inoltre, due lavaggi aggiuntivi con un tampone contenente 50 mM imidazolo hanno migliorato ulteriormente la purezza della proteina (Figura 18). Questa proteina è stata utilizzata in saggi di legame al DNA.

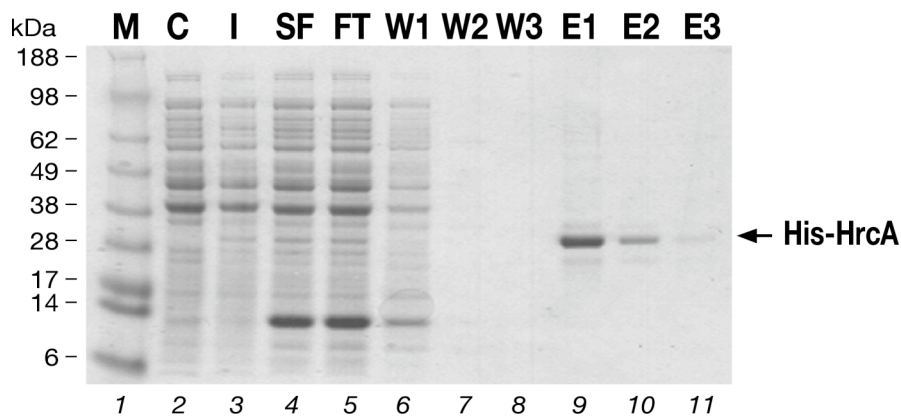


Figura 18. Purificazione finale della proteina ricombinante His-HrcA. Analisi SDS-PAGE di tutti i passaggi della purificazione di His-HrcA eseguita seguendo il protocollo finale descritto in 'Metodi'. Legenda: M, marker di pesi molecolari, con indicati sulla sinistra i pesi molecolari corrispondenti a ciascuna banda; C, estratto proteico totale da cellule non indotte; I, estratto proteico totale da cellule indotte; SF, frazione solubile; FT, flow-through; W1-2, due lavaggi della colonna eseguiti con Wash Buffer contenente 20 mM imidazolo; W3, il primo dei due lavaggi della colonna con Wash Buffer contenente 50 mM imidazolo; E1-2-3, eluati.

C.2.3 Legame della proteina His-HrcA al proprio promotore

Al fine di testare la funzionalità della proteina purificata His-HrcA, è stato eseguito un saggio *in vitro* di legame al DNA. Precedenti studi avevano dimostrato che HrcA è in grado di legare, *in vivo*, il proprio promotore (*Phrc*) (Spohn et al., 2004): di conseguenza, si è deciso di eseguire un saggio di filter binding utilizzando come sonda un frammento di 308 basi comprendente la regione promotrice di *hrcA* (*Phrc*). Il frammento *Phrc* marcato radioattivamente è stato incubato con quantità crescenti di proteina His-HrcA purificata e il legame è stato saggiato misurando la ritenzione dei complessi proteina-DNA su filtri di nitrocellulosa. La Figura 19 mostra come il legame di His-HrcA è riscontrabile a concentrazioni nell'ordine di 100 nM di proteina monomerica; inoltre, si ha la saturazione del 50% del probe ad una concentrazione di monomero di circa 350 nM (costante di dissociazione apparente). Da notare, inoltre, è il profilo sigmoidale della curva di legame, indicativo di un legame di tipo cooperativo.

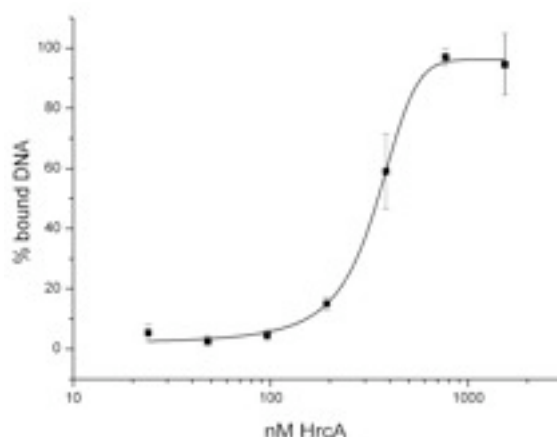


Figura 19. Curva di legame di HrcA alla regione promotrice del gene *hrcA*. Un saggio di filter binding è stato eseguito incubando un frammento di DNA marcato di 308 basi, comprendente il promotore di *hrcA* (*Phrc*), con quantità crescenti di proteina purificata His-HrcA (simboli quadrati). I risultati indicati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti. Le barre verticali indicano la deviazione standard.

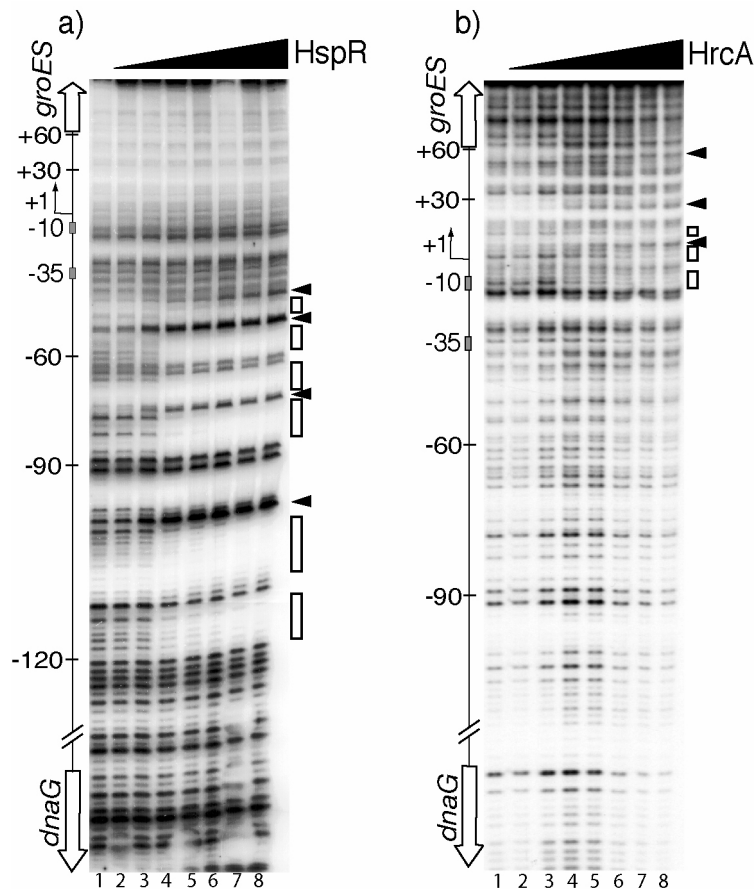
Da questo saggio è stato possibile concludere che la proteina ricombinante His-HrcA, purificata come descritto in precedenza, è funzionale ed utilizzabile per ulteriori saggi biochimici.

C.2.4 Saggi di DNase I footprinting sui promotori *Pgro* e *Phrc* con le proteine HrcA and HspR

Precedenti lavori hanno già dimostrato che sia HrcA che HspR sono in grado di legare direttamente i promotori degli operoni *groES-groEL* e *hrcA-grpE-dnaK* (*Pgro* e *Phrc*), reprimendone in tal modo la trascrizione (Spohn et al., 2004; Spohn and Scarlato, 1999b). Inoltre, i siti di legame del repressore HspR sui due promotori sono già stati identificati (Spohn and Scarlato, 1999b). Con l'intento di mappare i siti di legame di HrcA e HspR sui promotori *Pgro* e *Phrc*, si è deciso di eseguire esperimenti di footprinting con DNasi I utilizzando sia HrcA che HspR. La proteina HspR è stata overespressa con una coda di istidine C-terminale in cellule di *E. coli* BL21 e purificata tramite cromatografia di affinità su colonna al nichel (Ni-NTA), come precedentemente descritto (Spohn and Scarlato, 1999b) (dato non mostrato).

In Figura 20a e 20c sono mostrati i risultati dei saggi eseguiti con HspR, rispettivamente, sui promotori di *hrcA* e *groES*. A livello del promotore *Pgro* (Figura 20a), in seguito all'aggiunta di 20 nM HspR-His (corsia 4) si ha la comparsa di quattro bande di ipersensibilità alla Dnasi I, indicate in figura da triangoli neri; sono evidenti anche zone di protezione, evidenziate da rettangoli bianchi. La regione interessata si estende dalla posizione -43 alla posizione -120 rispetto al sito d'inizio della trascrizione. Questo risultato è in accordo con i dati precedentemente pubblicati (Spohn and Scarlato, 1999b). Lo stesso esperimento è stato eseguito sul promotore *Phrc* ed il risultato è riportato in Figura 20c. E' evidente come, anche in questo caso, l'aggiunta di quantità crescenti di proteina ricombinante HspR-His porti alla comparsa di quattro bande di ipersensibilità alla DNasi I (triangoli neri) e a zone di protezione (rettangoli bianchi). La regione di protezione si estende dalla posizione -78 alla posizione -156, rispetto al sito d'inizio della trascrizione. Anche in questo caso vi è accordo con i siti di legame precedentemente identificati (Spohn and Scarlato, 1999b).

Successivamente, le stesse sonde sono state utilizzate in esperimenti di footprinting con la proteina ricombinante His-HrcA. A livello del promotore *Pgro*, l'aggiunta di 18 nM His-HrcA (Figura 2ob, corsia 4) porta alla comparsa di tre siti ipersensibili alla DNasi I (triangoli neri), mentre alcune bande tendono ad indebolirsi e scomparire (rettangoli bianchi) e tali effetti si accentuano all'aumentare della concentrazione di His-HrcA. La regione interessata da questi effetti si estende dalla posizione -16 alla +58, rispetto all'inizio di trascrizione. Infine, il footprint eseguito con His-HrcA sul promotore *Phrc* (Figura 2od) mostra una regione di protezione di 30 nucleotidi, dalla posizione -30 alla posizione -60. In questo caso, l'aggiunta di quantità crescenti di His-HrcA porta alla comparsa di una banda di ipersensibilità alla DNasi (triangolo nero), localizzata al centro della zona di protezione (rettangoli bianchi), in posizione -45.



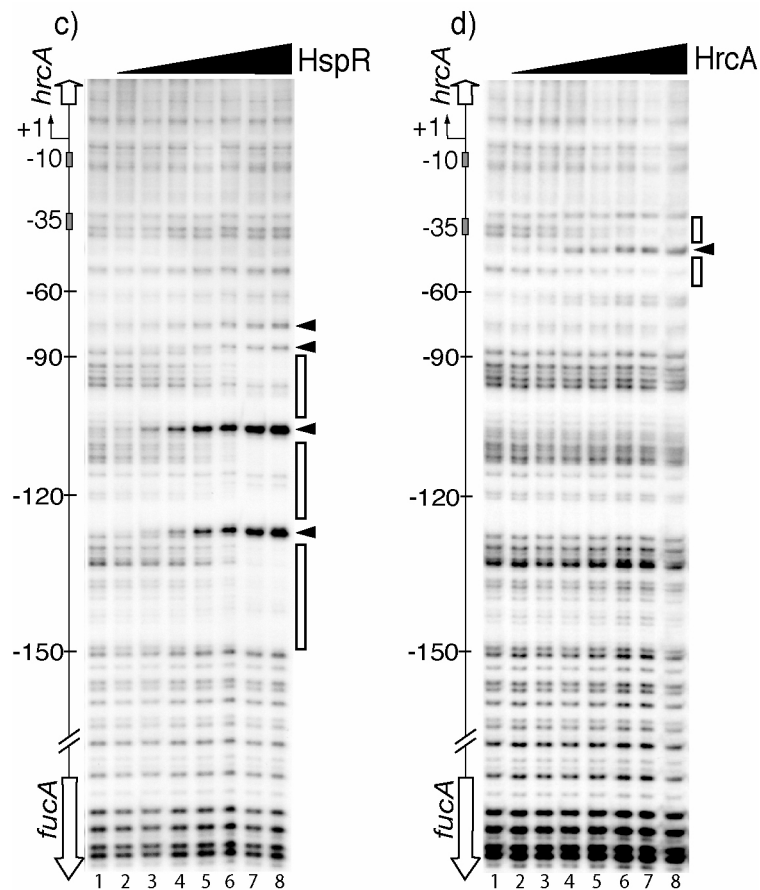


Figura 20. DNasi I footprintings con le proteine HspR e HrcA sui promotori *Pgro* e *Phrc*. (a) Frammenti specifici marcati comprendenti i promotori *Pgro* (a e b) e *Phrc* (c e d) sono stati incubati con quantità crescenti di proteina ricombinante HspR/HrcA; in particolare: (a e c): corsie 1-8: aggiunto, rispettivamente, 0, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 100 nM HspR; (b): corsie 1-8: aggiunto rispettivamente 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 180 nM HrcA. (d): corsie 1-8: aggiunto rispettivamente 0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 18, 24 nM HrcA. I rettangoli bianchi sulla destra dei gels indicano regioni di protezione dalla digestione con DNasi I, mentre i triangoli neri indicano bande di ipersensibilità alla digestione con DNasi I. I numeri sulla sinistra di ciascun gel indicano la posizione rispetto al sito d'inizio della trascrizione (+1, in corrispondenza della freccia ricurva). Le frecce grandi verticali indicano le ORFs, il cui nome è scritto in verticale.

Dagli esperimenti sopra descritti si può concludere che, a livello di entrambi i promotori, il sito di legame di HrcA si trova immediatamente a valle di quello di HspR. L'organizzazione dei siti di legame dei due regolatori è schematizzata in Figura 21. In entrambi i casi il legame di HrcA avviene in corrispondenza delle sequenze promotrici: più precisamente, sul promotore *Pgro*, l'area di protezione comprende la sequenza promotrice -10 ed il sito d'inizio della trascrizione, mentre, a livello del promotore *Phrc*, la regione

contattata dalla proteina comprende la sequenza -35.

Un'interessante osservazione emerge dall'analisi delle sequenze contattate da HrcA: è possibile, infatti, individuare una sequenza palindromica imperfetta (indicata dalle due frecce nere convergenti in Figura 21), che mostra omologie con una sequenza chiamata CIRCE e legata da HrcA in *B. subtilis* (Zuber and Schumann, 1994). La presenza di queste sequenze CIRCE-like, già precedentemente ipotizzate essere il target di HrcA (Spohn et al., 2004), sono riportate in Figura 21, allineata fra loro, e mostrano il 48% di identità in 27 paia di basi. Su entrambi i promotori, inoltre, la regione di legame di HrcA risulta essere distante da quella di HspR, essendo separate solamente da 25 basi nel caso di *Pgro* e da 18 basi nel caso di *Phrc*.

Siccome, *in vivo*, entrambi i regolatori sono necessari per il controllo trascrizionale dei promotori *Pgro* e *Phrc*, abbiamo ipotizzato un possibile legame cooperativo dei due. Per saggiare questa ipotesi abbiamo eseguito esperimenti di DNasi I footprintings utilizzando le due proteine in modo competitivo. Indipendentemente dall'ordine delle proteine aggiunte alla reazione di legame, le affinità stimate sono rimaste immutate (dati non mostrati). A supporto di questo risultato saggi di GST pull-down, eseguiti per verificare un'eventuale interazione diretta proteina-proteina tra i due regolatori, sembrano escludere tale ipotesi (dati non mostrati).

In conclusione, HrcA e HspR legano i promotori *Pgro* e *Phrc* in modo indipendente l'una dall'altra, suggerendo che altri fattori potrebbero essere coinvolti nel meccanismo di repressione.

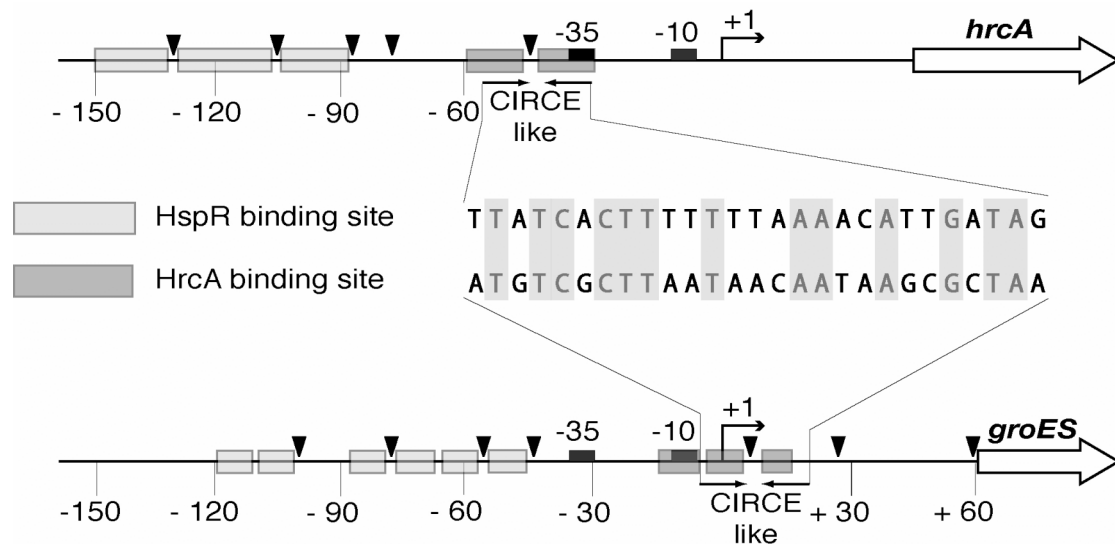


Figura 21. Rappresentazione schematica dei siti di legame di HrcA e HspR sui promotori *Pgro* e *Phrc*. Per ciascun promotore, la freccia grande indica la prima ORF dell'operone; i numeri si riferiscono alla posizione rispetto al sito d'inizio della trascrizione (indicato dalla freccia ricurva); le sequenze promotrici -10 e -35 sono rappresentate da rettangoli neri. I rettangoli semitrasparenti grigio chiaro e grigio scuro indicano, rispettivamente, le zone di protezione dalla digestione con DNasi I di HspR e HrcA; le punte di freccia nere indicano i siti di ipersensibilità alla digestione con DNasi I. Le frecce convergenti indicano le putative sequenze ripetute invertite CIRCE-like; tali sequenze sono allineate al centro della figura, con evidenziati in grigio i nucleotidi conservati tra le due CIRCE-like.

C.2.5 Il complesso GroES-GroEL modula positivamente il legame di HrcA al promotore *Phrc* *in vitro*

E' noto dalla letteratura che, in varie specie batteriche, la chaperonina GroE è in grado di modulare positivamente l'attività di legame al DNA del repressore HrcA (Mogk et al., 1997; Reischl et al., 2002; Wilson et al., 2005). Per verificare se questo modello fosse valido anche in *H. pylori* ed, eventualmente, se GroE fosse in grado di influenzare l'attività anche di HspR, sono stati eseguiti saggi *in vitro* di legame al DNA con le diverse proteine ricombinanti. In particolare, le proteine GroES e GroEL sono state over-espresse in cellule di *E. coli* BL21 e purificate come proteine ricombinanti con una coda di istidine carbossi-terminale, come descritto nella sezione 'Metodi'.

In Figura 22 sono riportati gli esperimenti di DNase I footprinting eseguiti sul promotore *Phrc*: tali saggi di legame al DNA sono stati eseguiti, in

parallelo, con le proteine His-HrcA (pannello a) e HspR-His (pannello b) sole ed in combinazione con il complesso GroESL.

Analizzando il footprinting eseguito con HrcA da sola, è possibile osservare come l'aggiunta di quantità non saturanti di proteina purificata provochi la comparsa di una banda di ipersensibilità alla DNasi I centrata in posizione -45 (indicata in Figura 22a, pannello di sinistra, da un triangolo nero), alla concentrazione di 120 nM HrcA (Figura 22a, corsia 6).

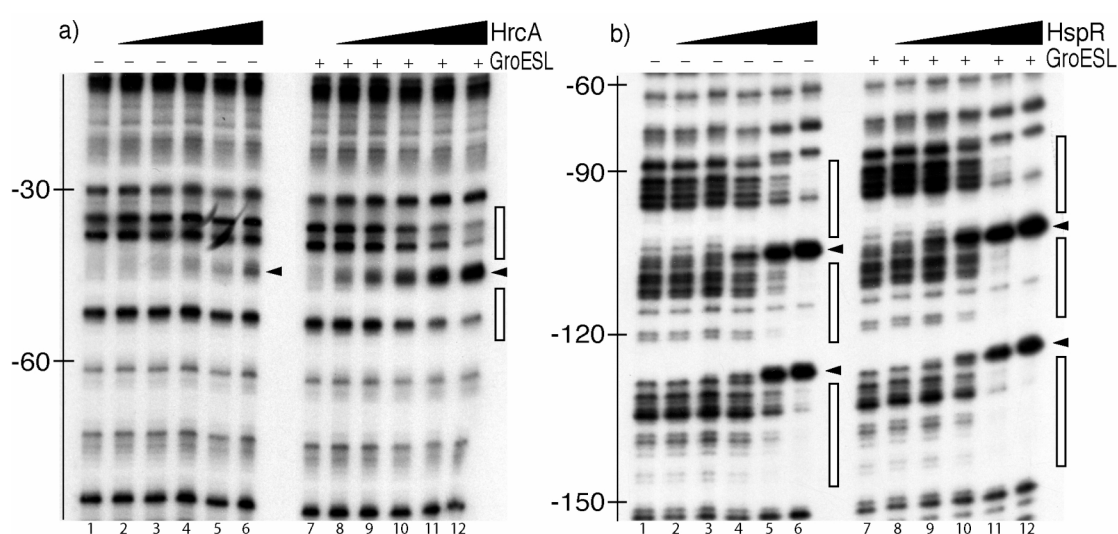


Figura 22. Effetto della chaperonina GroESL sulla affinità di legame di HrcA e HspR al promotore *Phrc* *in vitro*.

(a) DNase I footprinting con la proteina HrcA sul promotore *Phrc* eseguito in assenza (gel di sinistra) ed in presenza (gel di destra) del complesso GroEL-GroES. Un frammento di DNA marcato, contenente il promotore di *hrcA* (*Phrc*), è stato incubato con quantità crescenti di proteina purificata His-HrcA. Corsie 1-6: 0, 7.5, 15, 30, 60, 120 nM di His-HrcA; in ciascuna reazione, è stata aggiunta BSA 240 nM. Corsie 7-12: 0, 7.5, 15, 30, 60, 120 nM His-HrcA; in ciascuna reazione, è stato aggiunto il complesso GroESL alla concentrazione 240 nM e ATP 500 μ M.

(b) DNase I footprinting con la proteina HspR sul promotore *Phrc* eseguito in assenza (gel di sinistra) ed in presenza (gel di destra) del complesso GroEL-GroES. Un frammento di DNA marcato, contenente il promotore di *hrcA* (*Phrc*) è stato incubato con quantità crescenti di proteina purificata His-HspR. Corsie 1-6: 0, 25, 50, 100, 200, 400 nM HspR-His; in ciascuna reazione, è stata aggiunta BSA alla concentrazione 800 nM. Corsie 7-12: 0, 25, 50, 100, 200, 400 nM HspR-His; in ciascuna reazione, è stato aggiunto il complesso GroESL alla concentrazione 800 nM e ATP 500 μ M. I rettangoli bianchi sulla destra di ciascun gel indicano le regioni di protezione dalla digestione con DNasi I, mentre le punte di freccia nere evidenziano i siti ipersensibili alla digestione con DNasi I. I numeri sulla sinistra dei gels si riferiscono alla posizione rispetto al sito d'inizio della trascrizione.

L'aggiunta di un eccesso molare di GroES-GroEL purificate, (rapporto molare GroES-GroEL:HrcA = 2:1) ed ATP determina la comparsa di questa banda di ipersensibilità alla DNasi I a concentrazioni di 7.5 nM HrcA, la cui intensità aumenta all'aumentare di His-HrcA (Figura 22a, corsie da 8 a 12). Risultano evidenti anche due regioni di protezione ai lati della banda di ipersensibilità (Figura 22a, pannello di destra, evidenziate da rettangoli bianchi). Questi dati suggeriscono che il complesso proteico GroESL è in grado di stimolare il legame del repressore HrcA al proprio promotore *Phrc*. Inoltre, considerando che la banda di ipersensibilità alla DNasi I compare ad una concentrazione di 120 nM HrcA e che la stessa banda appare a 7.5 nM HrcA in presenza di GroESL, si può concludere che l'incremento di affinità di HrcA per l'operatore del promotore *Phrc* aumenta di circa 16 volte.

Lo stesso approccio è stato seguito per verificare l'ipotesi che la chaperonina GroE potesse avere un effetto positivo anche sul legame di HspR al promotore *Phrc*: i footorintings relativi sono riportati in figura 22b. Contrariamente a prima, in questo caso gli effetti dovuti al legame di HspR al promotore *Phrc* non cambiano.

I dati ottenuti da questi saggi supportano la tesi che la chaperonina GroESL, *in vitro*, è in grado di stimolare il legame del repressore heat shock HrcA, e non di HspR, al promotore del gene *hrcA* (*Phrc*).

C.3 Analisi trascrizionale con DNA-macroarrays

C.3.1 Trascrittomi di HrcA e HspR

Con lo scopo di identificare potenziali nuovi geni regolati da HrcA, HspR o da entrambi i regolatori, si è eseguita un'analisi trascrizionale su scala genomica attraverso macroarrays di DNA, utilizzando RNA estratto sia da cellule wild-type, sia da cellule mutanti, cresciute fino alla fase esponenziale. In Figura 23 sono rappresentati schematicamente gli operoni *hrcA-grpE-dnaK* e *cbpA-hspR-helicase* dei diversi ceppi impiegati in questa analisi.

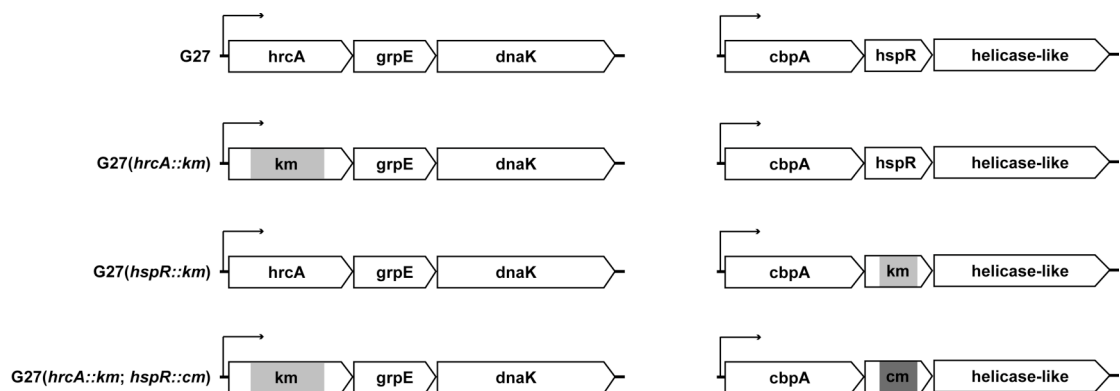


Figura 23. Ceppi di *H. pylori* utilizzati nei trascrittomi di HrcA/HspR. Rappresentazione schematica degli operoni *hrcA-grpE-dnaK* e *cbpA-hspR-helicase-like* nei diversi ceppi, indicati sulla sinistra. Le frecce indicano le varie ORFs. Le cassette per la resistenza alla kanamicina (*km*) e al cloramfenicolo (*cm*) sono colorate, rispettivamente in grigio chiaro e grigio scuro.

I rapporti $\Delta hrcA/wt$, $\Delta hspR/wt$ e $\Delta hrcA-\Delta hspR/wt$ dei segnali, normalizzati sull'attività totale, derivanti da tre diversi esperimenti sono stati validati statisticamente ($p \text{ value} \leq 0.05$) e confrontati fra loro. Il set di dati che si è generato da questo tipo di analisi è riportato di seguito, in Tabella 5.

In totale, 43 geni risultano essere up- o down- regolati almeno 1.5 volte nel doppio mutante ($\Delta hrcA-\Delta hspR$) e/o in uno dei singoli mutanti ($\Delta hrcA$ e/o $\Delta hspR$); 14 di questi geni risultano essere repressi da uno o da entrambi i regolatori, mentre 29 geni sono down-regolati nei ceppi mutanti (Tabella 5).

Come atteso, molti dei geni il cui controllo ad opera di HrcA e/o di HspR era già noto, sono stati selezionati in questa analisi. Ad esempio, la trascrizione dell'operone *cbpA-hspR-helicase* (HP1024-1025-1026) risulta essere derepressa nel mutante $\Delta hspR$ e nel doppio mutante $\Delta hrcA-\Delta hspR$ ma non nel mutante $\Delta hrcA$ e, quindi, la trascrizione di questo operone è repressa solamente dal regolatore HspR.

Genome ORF	HrcA	HspR	HrcA/HspR	Promotore	Annotazione
Repressi da HrcA					
HP0229	1,64	-1,21	2,49		outer membrane protein (omp6)
HP0630	1,65	-1,56	1,54		modulator of drug activity (mda66)
HP0916	1,57	1,01	1,51		iron-regulated outer membrane protein (frpB)
HP1177	1,29	-1,56	1,61		outer membrane protein (omp27)
Repressi da HspR					
HP0692	-1,24	1,53	-1,67		3-oxoadipate coA-transferase subunit B (yxjE)
HP1024	-1,10	10,09	4,12		co-chaperone-curved DNA binding protein A (CbpA)
HP1025	1,15	-5,50	-3,79		putative heat shock protein (hspR)
HP1026	1,10	3,58	2,35		conserved hypothetical helicase-like protein
Repressi da HrcA/HspR					
HP0010	1,28	2,14	1,76		chaperone and heat shock protein (groEL)
HP0011	1,47	2,26	1,98		co-chaperone (groES)
HP0109	-1,39	3,87	-1,22		chaperone and heat shock protein 70 (dnaK)
HP0110	-1,39	4,91	-1,23		co-chaperone and heat shock protein (grpE)
HP0722	3,45	1,84	2,98		outer membrane protein (omp16)
HP0724	4,88	2,49	3,56		anaerobic C4-dicarboxylate transport protein (dcuA)
Indotti da HrcA					
HP0295	-1,96	-1,23	-3,40	54	flagellin B homolog (fla)
HP0367	-1,66	-1,33	-2,52	int	H. pylori predicted coding region HP0367
HP0472	-3,77	1,03	-2,62	28	outer membrane protein (omp11)
HP0601	-3,31	-1,22	-1,88	28	flagellin A (flaA)
HP0751	-2,56	-1,06	-2,51	28	polar flagellin (flaG)
HP0752	-2,96	-1,10	-2,86	28	flagellar hook-associated protein 2 (fliD)
HP0753	-1,75	-1,02	-1,75	28	flagellar protein (fliS)
HP0868	-1,68	-1,33	-2,20	54	H. pylori predicted coding region HP0868
HP0869	-1,58	-1,05	-1,89	54	hydrogenase expression/formation protein (hypA)
HP0907	-1,75	-1,14	-1,87	54	hook assembly protein, flagella (flgD)
HP0908	-1,47	-1,12	-2,03	54	flagellar hook protein homolog (flgE2)
HP1001	-1,55	-1,24	-1,50		H. pylori predicted coding region HP1001
HP1052	-1,87	1,05	-1,45	28	UDP-3-O-acetyl N-acetylglucosamine deacetylase (envA)
HP1120	-1,52	-1,12	-1,91	54	H. pylori predicted coding region HP1120
HP1122	-1,60	-1,01	-1,46	int	H. pylori predicted coding region HP1122 (anti sigma factor)
HP1243	-2,20	1,08	-1,54		outer membrane protein (omp28)
HP1440	-1,55	-1,21	-1,46	int	H. pylori predicted coding region HP1440
Indotti da HspR					
HP0009	-1,24	-1,77	-1,46		outer membrane protein (omp1)
HP0556	1,12	-1,53	-1,44		H. pylori predicted coding region HP0556
Indotti da HrcA/HspR					
HP0115	-3,08	-1,32	-22,92	54	flagellin B (flaB)
HP0119	-1,90	-1,43	-1,40		H. pylori predicted coding region HP0119
HP0366	-2,05	-1,59	-3,86	int	PseC (spore coat polysaccharide biosynthesis protein C)
HP0870	-2,78	-1,45	-9,71	28	flagellar hook (flgE)
HP0906	-2,85	-1,80	-61,08	54	flagellar hook length control protein (FliK)
HP1076	-2,27	-1,84	-2,65	54	H. pylori predicted coding region HP1076
HP1119	-3,08	-1,57	-11,65	54	flagellar hook-associated protein 1 (HAP1) (flgK)
HP1188	-1,69	-1,48	-1,51		H. pylori predicted coding region HP1188
HP1233	-2,51	-2,00	-5,96	54	H. pylori predicted coding region HP1233
HP1559	-1,53	-1,55	-1,85	int	flagellar basal-body rod protein (flgB) (proximal rod protein)

Tabella 5. Tabella comprendente tutti i geni, selezionati secondo i parametri descritti in ‘Metodi’, derivanti dall’analisi dei trascrittomi di HrcA e HspR. Per i geni selezionati, il cui locus nel genoma di *H. pylori* 26695 è indicato nella colonna ‘Genome ORF’ e la cui annotazione è riportata nell’ultima colonna a destra, sono indicati i rapporti medi tra i livelli di trascritto nel ceppo mutante e nel wild-type: in particolare, colonna HrcA = rapporto $\Delta hrcA/wt$; colonna HspR = $\Delta hspR/wt$; colonna HrcA/HspR = $\Delta hrcA-\Delta hspR/wt$. Un valore negativo indica che l’espressione di tale gene è minore nel ceppo mutante rispetto al wild-type: in tal caso viene riportato il rapporto mutante/wt con il segno negativo. Nella colonna ‘Promotore’ sono riportati i promotori sigma 54 (indicati con ‘54’), sigma 28 (‘28’) dipendenti, mentre con il simbolo ‘int’ si vogliono indicare geni controllati da promotori dipendenti da più fattori sigma (secondo (Niehus et al., 2004)).

Un altro esempio, la trascrizione dell’operone *groES-groEL* (HP0010-0011) e dei geni *grpE* e *dnaK* (HP109-110) risulta chiaramente repressa da HspR, essendo derepressa nel mutante $\Delta hspR$ e nel doppio mutante $\Delta hrcA-\Delta hspR$ e, apparentemente, invariata nel mutante $\Delta hrcA$ (Tabella 5).

Quest'ultimo dato, riguardo al controllo trascrizionale dell'operone di *dnaK*, è in contrasto con lavori precedenti che dimostravano la repressione della trascrizione di tale operone ad opera di entrambi i repressori HrcA e HspR (Spohn et al., 2004). Nel presente studio, invece, non si riscontrano variazioni significative di quantità di trascritto del gene *hrcA* nel mutante per HrcA rispetto al wild-type. La natura di tale discrepanza va probabilmente ricercata nelle diverse condizioni sperimentali utilizzate nei due casi: mentre nel presente lavoro si sono utilizzati macroarrays contenenti ORFs per misurare l'ammontare dei trascritti cellulari, i lavori precedenti si erano indirizzati sull'analisi dell'inizio di trascrizione, concentrandosi sul rilevamento del 5' dell'RNA. In queste diverse condizioni, possono emergere differenze dovute ad un diverso accumulo di prodotti intermedi di degradazione dell'RNA *in vivo*.

Oltre a questi geni, già noti essere bersaglio della regolazione di HrcA e/o di HspR, la trascrizione di altri due geni risulta essere derepressa in tutti e tre i ceppi mutanti: in particolare il gene *dcuA* (HP0724, che codifica per un trasportatore di C₄-dicarbossilati) ed il gene *omp16* (HP0722, codificante per un'outer membrane protein). Questi geni sembrano quindi essere repressi da entrambi i regolatori HrcA e HspR.

Contrariamente a questi ultimi geni, la trascrizione dei geni *omp6*, *mda66*, *frpB* e *omp27* risulta derepressa solamente nel mutante $\Delta hrcA$ e nel doppio mutante $\Delta hrcA-\Delta hspR$, sembrando quindi regolati esclusivamente da HrcA; inoltre, per i geni *mda66* e *omp27* la trascrizione sembra ridotta nel mutante $\Delta hspR$, il che suggerisce un possibile effetto positivo mediato da HspR.

I dati più interessanti, che emergono dall'analisi dei trascrittomi, riguardano un gruppo di 29 geni che mostrano un livello di trascrizione ridotto nei ceppi mutanti, rispetto al wild-type, suggerendo, in tal modo, un effetto positivo dei regolatori. In particolare, il livello di trascritto di 17 geni appare inferiore, rispetto al wild-type, nel mutante $\Delta hrcA$ e nel doppio mutante $\Delta hrcA-\Delta hspR$ (Tabella 5); altri due geni (*omp1* e *HP0556*), invece, risultano indotti da HspR. Infine, la trascrizione di un gruppo di 10 geni risulta essere influenzata da entrambi i regolatori: i livelli di trascritto di tali geni, infatti, risultano essere significativamente inferiori, rispetto al wild-type,

in tutti i ceppi mutanti utilizzati in questa analisi. La maggior parte di questi 29 geni, la cui trascrizione risulta essere repressa nei ceppi mutanti, è coinvolta nella regolazione e nell'assemblaggio dell'apparato flagellare del batterio (Figura 24): si può notare come l'espressione di geni, quali *flaA* e *flaB*, codificanti per proteine costituenti il flagello, e di geni coinvolti nella formazione delle varie strutture del flagello, come *flgD*, *flgE*, *flgE2*, *fliK*, *flgK* (hook) e *flgB* (basal body) siano ridotti nei ceppi mutanti (Tabella 5).

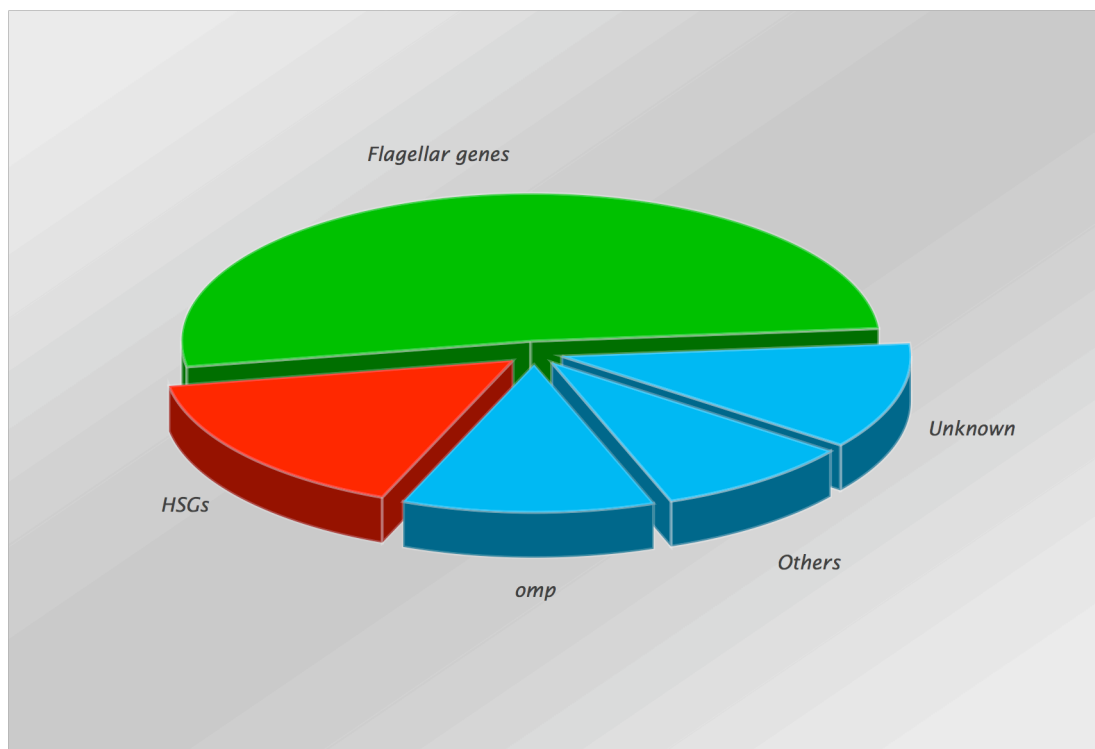


Figura 24. Grafico a torta rappresentante le categorie funzionali di tutti i geni (43 in totale) identificati con l'analisi dei trascrittomi, che appaiono essere up- o down regolati in uno e/o nel doppio mutante (elencati in Tabella 5). La maggior parte di tutti i geni influenzati dalla mutazione di HrcA e/o HspR sono geni coinvolti nella biosintesi e regolazione dell'apparato flagellare. Legenda: HSGs: heat shock genes; omp: outer membrane proteins; unknown: hypothetical ORFs; Flagellar genes geni coinvolti nella biosintesi e regolazione dell'apparato flagellare.

Una caratteristica molto interessante, che accomuna questi geni down-regolati nei ceppi mutanti, è il tipo di promotore che controlla la loro trascrizione: la trascrizione della quasi totalità di questi 29 geni, infatti, è controllata da promotori sigma-54 (11/29) o sigma-28 (7/29) dipendenti ed

alcuni di essi (5/29) da più di un promotore (indicati come 'int' in Tabella 5) (Niehus et al., 2004). D'altra parte, molti altri geni coinvolti nella biosintesi e regolazione dell'apparato flagellare ma controllati da promotori vegetativi dipendenti dal fattore sigma 80, non mostrano variazioni significative nei ceppi mutanti, rispetto al wild-type.

C.3.2 Primer extension su geni identificati dai trascrittomi di HrcA e HspR

Per confermare le variazioni della quantità di trascritto emerse dall'analisi dei trascrittomi, sono stati selezionati i geni *mda66* e *flaB* come esempi rappresentativi della diversa regolazione operata da HrcA e HspR. In particolare, sono stati eseguiti esperimenti di primer extension utilizzando campioni di RNA estratti dai ceppi G27 wild-type, G27 (*hrcA::km*), G27 (*hspR::km*) and G27 (*hrcA::km; hspR::cm*), cresciuti fino in fase esponenziale, sia per mappare i promotori che per studiarne la regolazione. I risultati di tali esperimenti sono riportati in Figura 25.

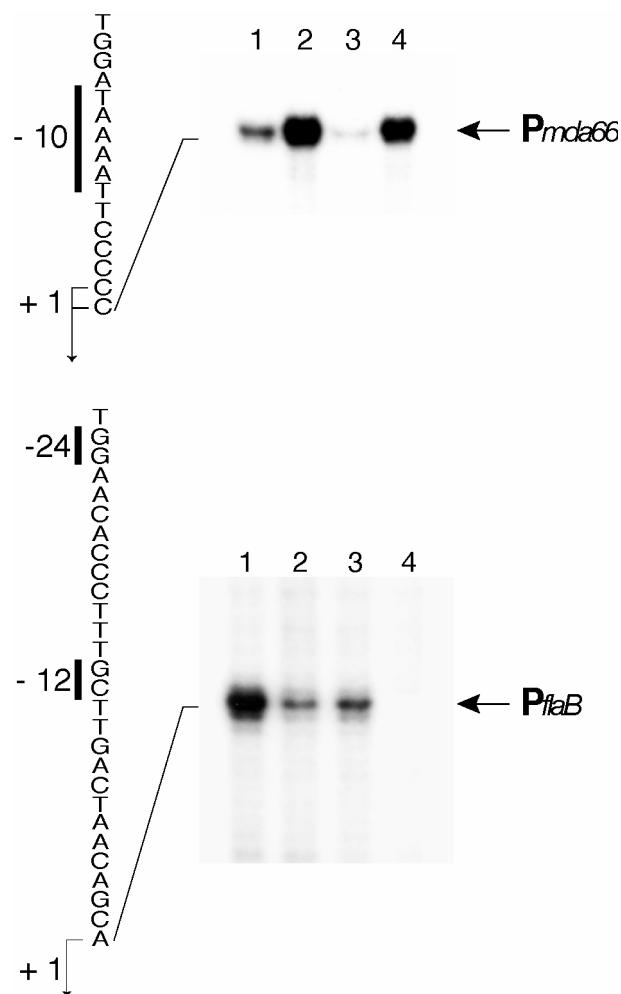


Figura 25. Analisi di primer extension sui promotori dei geni *mda66* e *flaB*. L'RNA totale estratto dai ceppi G27 (corsia 1), G27 (*hrcA::km*) (corsia 2), G27 (*hspR::km*) (corsia 3) and G27 (*hrcA::km; hspR::cm*) (corsia 4) sono stati ibridati con gli oligonucleotidi marcati *mda66PE* (a) and *flaB* (b) (Tabella 3) ed elongati con la trascrittasi inversa. I prodotti di elongazione sono indicati dalla freccia nella parte destra dei gel. I promotori, clonati in un vettore, sono stati sequenziati in parallelo con gli stessi primers usati nelle reazioni di primer extension e le relative sequenze a monte del sito d'inizio della trascrizione sono riportate sulla sinistra: la sequenza -10 in (a) o le sequenze -12/ -24 (c) sono evidenziate da rettangoli verticali neri, mentre i nucleotidi corrispondenti al sito d'inizio della trascrizione (+1) sono indicati da frecce ricurve.

Per quanto riguarda il gene *mda66*, il mappaggio del promotore ha consentito di individuare il sito d'inizio della trascrizione localizzato 25 basi a monte del codone d'inizio della traduzione, preceduto da una putativa sequenza -10 (TAAAAT), tipica di un promotore dipendente da un fattore sigma vegetativo sigma 80 (Figura 25a). Il saggio di primer extension ha confermato la regolazione HrcA-dipendente osservata nell'analisi con i macroarrays: come si può osservare in Figura 25a, infatti, il livello di trascritto

del gene *mda66* risulta significativamente maggiore nel mutante *hrcA* e nel ceppo doppio mutante, mentre in mancanza di HspR esso appare leggermente ridotto, rispetto al ceppo wild-type.

Infine, come caso rappresentativo del gruppo di geni down-regolati nei ceppi mutanti, è stato analizzato il gene *flaB*: precedenti studi avevano dimostrato che la trascrizione di questo gene è controllata da un promotore sigma 54-dipendente (Spohn and Scarlato, 1999a). Il saggio di primer extension, riportato in Figura 25b, ha mostrato una marcata riduzione della trascrizione dal promotore di *flaB* in tutti e tre i ceppi mutanti: come atteso dai dati dei macroarrays, i livelli di trascritto nei ceppi mutanti sono molto inferiori rispetto al ceppo wild-type, addirittura non misurabili nel ceppo doppio mutante $\Delta hrcA$ - $\Delta hspR$ (atteso infatti 23 volte inferiore rispetto al wild-type, Tabella 5).

Questi saggi di primer extension correlano con le indicazioni emerse dai trascrittomi, suggerendo l'esistenza di diversi set di geni, influenzati in modi diversi dalla mutazione di HrcA e/o HspR.

C.3.3 HrcA e HspR sono necessari per la motilità in *H. pylori*

E' riportato in letteratura che il ceppo mutante $\Delta hspR$ di *H. pylori* presenta un fenotipo non motile (Spohn and Scarlato, 1999a) e lo stesso fenotipo è stato osservato anche in *Campylobacter jejuni* (Andersen et al., 2005), batterio strettamente correlato a *Helicobacter*. I dati emersi dall'analisi dei trascrittomi dei due regolatori, inoltre, confermano che gran parte dei geni deputati al controllo della motilità sono down-regolati sia nel mutante *hspR*; ma tali dati sembrano includere anche il regolatore HrcA nel controllo della motilità. Per avere un riscontro fenotipico di tale osservazione è stato eseguito un saggio di motilità anche sul mutante per HrcA, analizzando la capacità delle cellule di diffondere in piastre a bassa concentrazione di agar. Per fare ciò, cellule dei ceppi analizzati sono state inoculate su piastre contenenti 0,3% agar e incubate per 72 ore a 37°C in condizioni microaerofile. In Figura 26 è riportata l'immagine di una piastra rappresentativa dell'esperimento: come si può chiaramente notare, l'area di diffusione delle

cellule dei ceppi mutanti $\Delta hrcA$, $\Delta hspR$ e $\Delta hrcA-\Delta hspR$ è severamente ridotta (Figura 26), rispetto a quella del ceppo wild-type, evidenziando in tal modo una perdita di motilità.

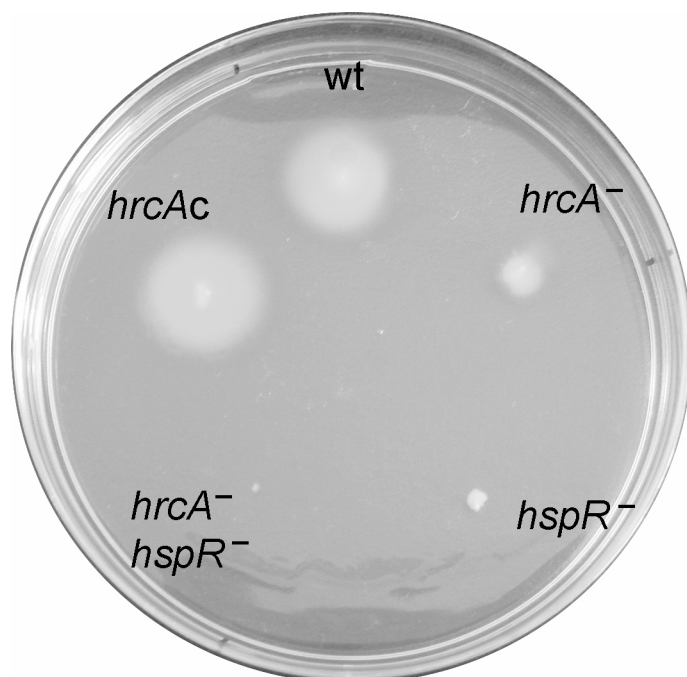


Figura 26. Saggio di motilità. I batteri sono stati inoculati a metà dello spessore del terreno con la punta di una pipetta su piastre di agar semisolido ed incubati per 72 ore a 37°C in condizioni microaerofile. I ceppi utilizzati in questo saggio sono i seguenti: wt: G27 wild-type; *hrcA*⁻: G27 (*hrcA::km*); *hspR*⁻: G27 (*hspR::km*); *hrcA*⁻*hspR*⁻: G27 (*hrcA::km*; *hspR::cm*); *hrcAc*: G27 (*hrcA-HA*).

La complementazione di HrcA consente il recupero del fenotipo motile, essendo la diffusione delle cellule del ceppo complementante del tutto comparabile a quella del ceppo wild-type. Dal risultato di questo esperimento si può concludere che entrambi i regolatori HrcA e HspR sono necessari ad *H. pylori* per la motilità.

D. Discussione

I microrganismi hanno evoluto diversi meccanismi che consentono loro di sopravvivere a rapide variazioni dell'ambiente che li circonda. In particolare, le heat shock proteins giocano un ruolo fondamentale nel proteggere i batteri dagli stress ambientali ai quali sono sottoposti. In particolare, queste proteine stabilizzano i polipeptidi parzialmente denaturati, ne assistono il ripiegamento corretto, prevengono la formazione di aggregati proteici deleteri per il batterio e degradano le proteine che non riescono a raggiungere il folding corretto. Nonostante questa classe di proteine sia altamente conservata fra tutte le specie batteriche, i microrganismi hanno evoluto differenti strategie per regolarne la risposta trascrizionale in seguito ad una improvvisa esposizione ad uno o più stress ambientali. *E coli* e numerosi altri batteri Gram negativi utilizzano fattori sigma specifici, che diventano attivi dopo l'esposizione allo stress e dirigono l'RNA polimerasi ai promotori target, mentre un sottogruppo di microrganismi Gram negativi e tutti i Gram positivi si avvalgono di specifici repressori trascrizionali che diventano inattivi in condizioni di stress, con conseguente derepressione dei promotori target.

Il controllo trascrizionale dei geni heat shock in *H. pylori* avviene attraverso un meccanismo di tipo negativo, in conseguenza anche della mancanza di un fattore sigma specifico. In particolare, lavori precedenti avevano dimostrato che due dei tre operoni contenenti i principali geni chaperone di *H. pylori* sono regolati negativamente dall'azione concertata di due repressori, HrcA e HspR. A livello di questi due operoni, erano noti i siti di legame di HspR, mentre per quanto riguarda HrcA, il legame ai due promotori era stato dimostrato unicamente attraverso esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina. Un'approfondita analisi di questo circuito di regolazione è stato fino ad ora ostacolato da problemi riscontrati durante l'overespressione e la purificazione di HrcA, passaggi necessari per successivi saggi biochimici *in vitro*.

D.1 Analisi bioinformatica e localizzazione subcellulare di HrcA

L'analisi bioinformatica di HrcA di *H. pylori* ha suggerito una possibile associazione di HrcA con la membrana interna e tale ipotesi è stata confermata sperimentalmente, verificando la presenza della proteina in preparati di membrana interna (Figura 11). Probabilmente, la porzione centrale idrofobica è responsabile di questa localizzazione cellulare. Considerando che il dominio di legame al DNA predetto è localizzato nella porzione amminoterminale della proteina, si può speculare che l'estremità N-terminale di HrcA sia esposta al citoplasma, mentre la porzione C-terminale sia confinata nello spazio periplasmatico. Questo modello mostra analogie con la situazione che si ritrova in *Vibrio cholerae*, in cui *toxT*, un'importante gene coinvolto nella cascata dei geni della virulenza, è direttamente attivato, in risposta a determinati stimoli ambientali, da un regolatore trascrizionale, chiamato ToxR, associato con la membrana interna (Krukoniš et al., 2000; Miller et al., 1987; Osorio and Klose, 2000; Zhu et al., 2002). In analogia con questo modello, è possibile speculare che HrcA sia in grado di percepire determinati stimoli ambientali tramite la porzione periplasmatica carbossi-terminale, che funzionerebbe da 'sensore', e che, in seguito ad un cambiamento conformazionale, si abbia una perdita di affinità per il legame al DNA della porzione ammino-terminale, con conseguente derepressione trascrizionale dei promotori regolati.

D.2 Espressione e purificazione di HrcA

Il principale problema che si è dovuto affrontare nel tentativo di overesprimere HrcA in forma ricombinante è stato l'effetto citotossico della proteina quando indotta in cellule di *E. coli*. In questo lavoro si è riusciti ad indurre l'espressione di HrcA in *E. coli* a 42°C (Figura 16a) e la proteina, espressa a questa temperatura, si ripartisce maggiormente nella frazione di proteine solubili (Figura 16b) e può essere purificata con buone rese in condizioni native (Figura 18). Probabilmente, nelle condizioni di stress termico in cui è stata fatta l'induzione, le proteine chaperones, indotte a 42°C, assistono il ripiegamento corretto della proteina, prevenendone in tal modo la degradazione prematura ed aumentandone la solubilità. HrcA, purificata da cellule cresciute in condizioni di shock termico, ha mostrato un legame

specifico ad un frammento di DNA contenente il promotore dell'operone *hrcA-grpE-dnaK* (Figura 19), noto target di HrcA di *H. pylori* (Spohn et al., 2004), indicando che la proteina ricombinante purificata risulta attiva ed utilizzabile per ulteriori saggi di legame al DNA.

D.3 Definizione dei siti di legame di HrcA sui promotori *Pgro* e *Phrc* e regolazione post-trascrizionale di HrcA ad opera della chaperonina GroE

Pur essendo già stato precedentemente dimostrato il legame diretto di HrcA sui promotori degli operoni *hrcA-grpE-dnaK* e *groES-groEL* attraverso immunoprecipitazione della cromatina (Spohn et al., 2004), la definizione dei siti di legame del repressore ai suddetti promotori è stata affrontata solo in questo lavoro, attraverso saggi di footprinting con DNasi I utilizzando la proteina purificata. In particolare, per entrambi i promotori, il sito di legame di HrcA si trova a valle del sito di legame di HspR, in corrispondenza di sequenze ripetute invertite che mostrano omologia con una sequenza denominata CIRCE, legata da HrcA in *B. subtilis* (Zuber and Schumann, 1994) (Figure 20 e 21). Il legame di HrcA, su entrambi i promotori, avviene in una posizione tale da occludere stericamente l'accesso all'RNA polimerasi: in un caso, infatti, (*Pgro*) la regione contattata da HrcA comprende la sequenza -10, mentre sull'altro promotore (*Phrc*) è la box -35 ad essere interessata dal legame del regolatore (Figura 21).

Come descritto precedentemente, i sistemi di regolazione CIRCE/HrcA e HAIR/HspR sono presenti anche in altri eubatteri, ma quando sono presenti entrambi nello stesso microrganismo solitamente regolano geni diversi per la risposta allo stress (Narberhaus, 1999). Ad esempio in *Streptomyces*, la regolazione negativa dei geni heat shock è a carico di tre diversi repressori: in particolare HrcA reprime, in condizioni fisiologiche, la trascrizione di *groE*, HspR reprime i geni codificanti DnaK e ClpB, mentre un terzo repressore chiamato RheA regola negativamente il gene *hsp18*, codificante per una piccola heat shock protein di tipo α (Servant and Mazodier, 2001). Risulta estremamente interessante, quindi, il caso di *H. pylori*, in cui entrambi i regolatori reprimono direttamente gli operoni di *groE* e di *dnaK*. Sono possibili diverse ipotesi per spiegare la necessità di due repressori per la

regolazione dei due promotori studiati, e soprattutto per spiegare il ruolo svolto da HspR, necessario per la repressione, seppur legando entrambi i promotori in una posizione molto distale: inizialmente si è ipotizzato un'interazione tra i due regolatori ed un legame di tipo cooperativo ai promotori regolati. D'altronde, esperimenti di footprinting con DNasi I eseguiti utilizzando in modo competitivo le due proteine per saggiare un possibile legame cooperativo dei due, ed esperimenti di GST pull-down per indagare una possibile interazione tra i due regolatori (descritto in 'Risultati', dati non mostrati), indicano che HrcA e HspR legano indipendentemente i promotori regolati e non interagiscono direttamente fra loro. Questi dati suggeriscono l'intervento di altri partners proteici con funzione mediatrice tra i due repressori e la possibilità che si formi un complesso multi-proteico stabile sul promotore. In altre parole, HspR potrebbe promuovere e/o stabilizzare il legame di HrcA al DNA in modo indiretto, interagendo con una proteina che fungerebbe da ponte tra le due, a formare un complesso stabile.

Il sistema appare ancora più complesso se si considera la regolazione post trascrizionale di HrcA messa in atto dalla chaperonina GroE. In questo lavoro, infatti, è stato dimostrato che il complesso GroES-GroEL è in grado di stimolare, *in vitro*, il legame del regolatore HrcA al proprio promotore. Come ricordato precedentemente, un meccanismo di regolazione post trascrizionale a carico di HrcA da parte di GroE è stato osservato anche in altri sistemi batterici, ad esempio in *Bacillus subtilis*, *Chlamydia trachomatis* ed altri (Mogk and Schumann, 1997; Reischl et al., 2002; Wilson et al., 2005). In *Streptomyces coelicolor*, invece, è stato dimostrato che la chaperonina DnaK media un regolazione post trascrizionale del repressore HspR, interagendo direttamente con esso e stimolandone il legame al DNA (Bucca et al., 2003; Bucca et al., 2000). Esperimenti da noi eseguiti sembrano escludere che, in *H. pylori*, esista un meccanismo di regolazione post trascrizionale su HspR di questo tipo: saggi di footprinting del tutto analoghi a quelli mostrati in Figura 22, eseguiti utilizzando, al posto di GroESL, la chaperonina DnaK ricombinante purificata di *H. pylori*, non evidenziano differenze significative riguardo la capacità di legame al DNA dei regolatori HrcA e HspR in presenza o assenza della chaperonina (dati non mostrati).

Considerando i dati a disposizione, sarebbe interessante in futuro eseguire esperimenti per capire se, come in altri sistemi, GroESL sia importante solamente per il folding di HrcA e non partecipi al legame al DNA assieme al regolatore, oppure se il complesso GroE-HrcA si leghi al promotore. Nel caso in cui GroE non partecipi al legame al DNA, sarebbe interessante pianificare esperimenti di immunoprecipitazione di uno o di entrambi i regolatori per isolare un eventuale complesso regolativo a livello dei promotori studiati ed identificare eventuali nuovi partners proteici di HrcA e HspR.

D.4 Analisi dei trascrittomi e fenotipo non-motile

L'analisi trascrizionale su scala genomica, attraverso DNA-microarrays, ha permesso di individuare un totale di 43 geni significativamente up- o down-regolati in seguito alla delezione di uno o di entrambi i regolatori HrcA e HspR (Tabella 5). Come atteso, e a conferma della consistenza dei dati emersi dai trascrittomi, molti geni il cui controllo ad opera di HrcA e/o di HspR era già noto, sono risultati selezionati anche in questo tipo di analisi. Oltre ai geni chaperone, tra i geni up-regolati in un singolo mutante e nel doppio mutante, e quindi repressi da uno o da entrambi i regolatori, non è possibile identificare un gruppo di geni appartenenti ad una particolare classe funzionale: ad esempio, contrariamente a *Campylobacter jejuni* e ad altri sistemi, i repressori heat shock HrcA e HspR di *H. pylori* non risultano coinvolti nel controllo delle proteasi ATP dipendente Clp.

Un gene che ha suscitato interesse, ancora poco studiato in *H. pylori*, è *mda66*: annotato come 'modulator of drug activity', questo gene codifica per una putativa NADPH deidrogenasi coinvolta nel processo di produzione e resistenza a tossine. Sebbene il dato degli arrays sia al limite di significatività (rapporto $\Delta hrcA/wt$ di 1.65, Tabella 5), la repressione HrcA dipendente è stata confermata attraverso primer extension (Figura 25). Inoltre, dopo aver mappato il promotore, l'analisi della sequenza nucleotidica ha messo in evidenza, nei pressi del sito d'inizio della trascrizione, una sequenza ripetuta invertita molto simile alla sequenza CIRCE-like trovata sul promotore *Phrc* e legata direttamente da HrcA (dato non mostrato). Esperimenti di footprinting eseguiti con HrcA ricombinante sembrano, però, escludere un legame diretto

del repressore al promotore di *mda66*, almeno nelle condizioni sperimentali utilizzate, suggerendo quindi un effetto indiretto del regolatore (dato non mostrato).

Il dato più interessante emerso dall'analisi dei trascrittomi di HrcA e HspR riguarda l'interconnessione tra i repressori heat shock e la motilità. Dall'analisi dei trascrittomi, infatti, è stato possibile individuare 29 geni apparentemente attivati da uno o da entrambi i regolatori: la maggior parte di questi codifica per componenti chiave dell'apparato flagellare, coinvolti sia nella formazione dei flagelli stessi, sia nella formazione delle altre strutture (uncino e corpo basale) (Tabella 5 e Figura 24). Il saggio di motilità su piastra (Figura 26), ha fornito anche una correlazione fenotipica con i dati trascrizionali: l'espressione, ridotta nei ceppi mutanti, di una serie di geni codificanti per elementi coinvolti nella formazione dei flagelli a livello trascrizionale correla, a livello fenotipico, con la non motilità dei batteri deleti per HspR e/o HrcA. La regolazione trascrizionale dei geni per la motilità risulta essere molto complessa in *H. pylori*, coinvolgendo sia sistemi a due componenti sia due fattori sigma specifici (Niehus et al., 2004). È interessante notare come, tra tutti i geni flagellari individuati attraverso i trascrittomi, la maggior parte di essi siano sigma 54/28 dipendenti. Dall'analisi dei dati, però, emerge che la mutazione di HrcA e/o di HspR non influenza l'espressione né di tali fattori sigma specifici, né di un regolatore noto di tali fattori; considerando inoltre che non è mai stato osservato che HrcA o HspR possano direttamente stimolare l'espressione genica, noi crediamo che l'effetto osservato sia di tipo indiretto. Le chaperonine, e soprattutto un loro corretto bilanciamento all'interno della cellula, potrebbero rivestire un ruolo importante nel corretto assemblaggio di un apparato flagellare funzionale. Se ciò è corretto, è possibile ipotizzare che la down-regolazione dei geni del flagello sia dovuta all'iperespressione delle chaperonine in seguito alla delezione dei repressori: un elevato livello di proteine chaperones potrebbe innescare un meccanismo a feedback per il circuito di regolazione dei geni per la motilità e la chemiotassi. Ad esempio la chaperonina GroE (oppure DnaK), overespressa, potrebbe sequestrare alcune proteine del flagello e questa situazione, percepita come carenza di

componenti flagellari dalla cellula, potrebbe portare ad un blocco della cascata trascrizionale.

Lo stato dell'arte della comprensione del circuito di regolazione dei geni chaperones in *H. pylori* è rappresentato schematicamente in Figura 27: come discusso sopra, la chaperonina GroESL stimola il legame di HrcA ai promotori regolati, mentre non ha effetto sul legame di HspR. Inoltre, i livelli cellulari della stessa GroESL e/o della chaperonina DnaK potrebbero essere coinvolte nella regolazione e nel corretto assemblaggio dell'apparato flagellare.

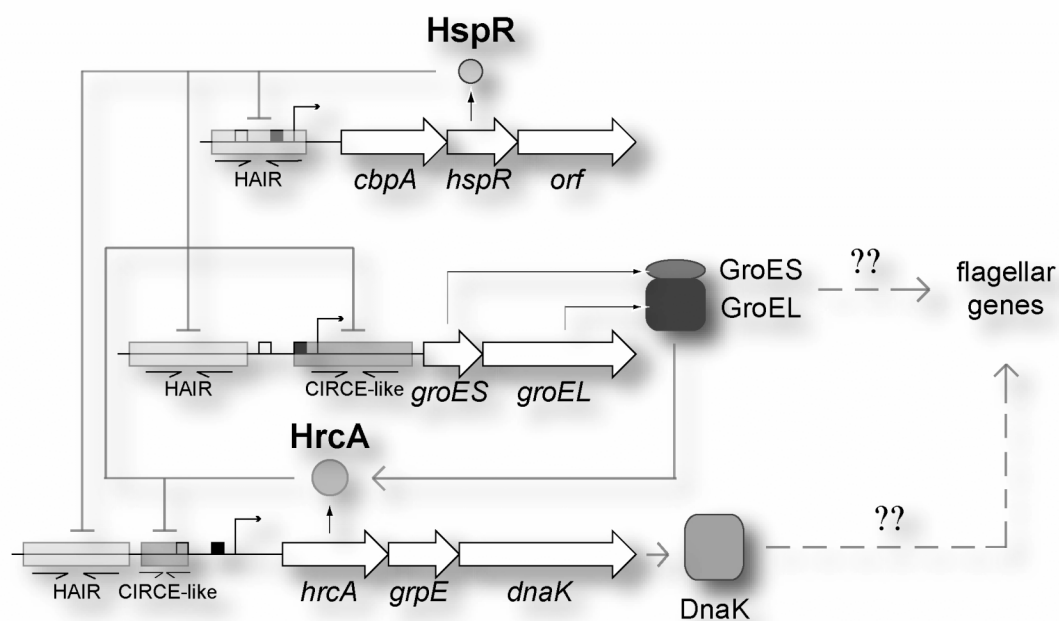


Figura 27. Rappresentazione schematica del circuito di regolazione che governa l'espressione delle principali heat shock proteins in *H. pylori*. Le frecce grandi vuote indicano le sequenze codificanti, i cui nomi sono indicati in corrispondenza di ciascuna di esse; le frecce ricurve indicano le posizioni dei promotori e le direzioni dei trascritti. I siti di legame dei regolatori HrcA e HspR sono indicati, rispettivamente, da rettangoli grigio scuri e grigio chiari, mentre le sequenze ripetute invertite contattate (HAIR per HspR e CIRCE-like per HrcA) sono rappresentate da frecce convergenti. La freccia di collegamento tra la chaperonina GroES/EL ed HrcA rappresenta la regolazione post-trascrizionale descritta in questo lavoro, mentre le frecce tratteggiate che collegano le chaperonine GroES/EL e DnaK ai geni flagellari rappresentano l'ipotesi formulata sopra di un effetto dell'iperespressione di una o entrambe le proteine sulla trascrizione dei geni flagellari.

E. Materiali

E.1 Ceppi batterici

- Ceppi di *Escherichia coli*:

Ceppo	Caratteristiche rilevanti	Referenza
<i>E.coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdS gal</i> (λ <i>clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>)	(Grodberg and Dunn, 1988)

Tabella 1. Ceppi di *E.coli* utilizzati in questo lavoro.

- Ceppi di *Helicobacter pylori*:

Ceppo	Caratteristiche rilevanti	Referenza
<i>H.pylori</i> G27	Isolato clinico; wild type.	(Xiang et al., 1995)
<i>H.pylori</i> G27 (<i>hrcA::km</i>)	Derivato da ceppo G27; la porzione del gene <i>hrcA</i> , dalla base 156 alla base 375, è stata sostituita da un cassetta per la resistenza alla kanamicina (<i>km</i>).	(Spohn et al., 2004)
<i>H.pylori</i> G27 (<i>hspR::cm</i>)	Derivato da ceppo G27; la porzione del gene <i>hspR</i> , dalla base 66 alla base 334, è stata sostituita da un cassetta per la resistenza alla kanamicina (<i>km</i>).	(Spohn et al., 2004)
<i>H.pylori</i> G27 (<i>hrcA::km; hspR::cm</i>)	Derivato da ceppo G27(<i>hrcA::km</i>); la porzione del gene <i>hspR</i> , dalla base 66 alla base 334, è stata sostituita da un cassetta per la resistenza al cloramfenicolo (<i>cm</i>).	(Spohn et al., 2004)
<i>H.pylori</i> G27 (<i>hrcA-myc</i>)	Derivato da ceppo G27(<i>hrcA::km</i>); il ceppo complementante <i>hrcA-myc</i> è stato ottenuto attraverso doppia ricombinazione del costrutto pVAC- <i>cat-hrcA-myc</i> .	(Spohn et al., 2004)
<i>H.pylori</i> G27 (<i>hrcA-HA</i>)	Derivato da ceppo G27(<i>hrcA::km</i>); il ceppo complementante <i>hrcA-myc</i> è stato ottenuto attraverso doppia ricombinazione del costrutto pVAC- <i>cat-hrcA-HA</i> .	(Roncarati et al., 2006)

Tabella 2. Ceppi di *H.pylori* utilizzati in questo lavoro.

E.2 Plasmidi e costrutti.

Plasmide	Caratteristiche rilevanti	Referenza
pGEM3	Vettore di clonaggio, Amp ^r	Promega
pGEM3-hrc1/6-km-hrc3/4	Due frammenti, amplificati tramite PCR dal DNA cromosomale di <i>H.pylori</i> G27, utilizzando le coppie di oligonucleotidi hrc1/hrc6 e hrc3/hrc4 sono stati digeriti rispettivamente con gli enzimi di restrizione <i>EcoRI/BamHI</i> e <i>BamHI/PstI</i> , ed inseriti all'interno del plasmide pGEM3, assieme alla cassetta per la resistenza alla kanamicina, digerita con l'enzima <i>BamHI</i> .	(Spohn et al., 2004)
pGEM3-hsp1/2-Km-hsp3/4	Due frammenti, amplificati tramite PCR dal DNA cromosomale di <i>H.pylori</i> G27, utilizzando le coppie di oligonucleotidi hsp1/hsp2 e hsp3/hsp4 sono stati digeriti rispettivamente con gli enzimi di restrizione <i>EcoRI/BamHI</i> e <i>BamHI/PstI</i> , ed inseriti all'interno del plasmide pGEM3, assieme alla cassetta per la resistenza alla kanamicina, digerita con l'enzima <i>BamHI</i> .	(Spohn and Scarlato, 1999b)
pGEM3-hsp1/2-cm-hsp3/4	Ottenuto dal costrutto pGEM3-hsp1/2-km-hsp3/4, nel quale la cassetta per la resistenza alla kanamicina è stata rimossa attraverso la digestione con l'enzima di restrizione <i>SmaI</i> e sostituita con la cassetta per la resistenza al cloramfenicolo, digerita con l'enzima <i>HincII</i> .	Questo lavoro
pGEM-T-Easy	Vettore di clonaggio, Amp ^r	Promega
pGEM-T-Easy- <i>Phrc</i>	Ottenuto dal vettore pGEM-T-Easy e contenente un frammento di 308 basi ottenuto tramite PCR (coppia di oligonucleotidi hrcA/hrcA1) al cui interno si trova la sequenza del promotore <i>Phrc</i> .	(Roncarati et al., 2006)
pHSS6	Vettore di clonaggio, km ^r	(Seifert et al., 1986)
pHSS6- <i>Phrc</i>	Ottenuto dal vettore pHSS6 e contenente un frammento di 450 basi ottenuto tramite PCR (coppia di oligonucleotidi hrc1/hrc2, Tabella 4) al cui interno si trova la sequenza del promotore <i>Phrc</i> .	(Roncarati et al., 2006)

pGEM-T-Easy-Pgro	Derivante dal vettore pGEM-T-Easy e contenente un frammento di 294 basi ottenuto tramite PCR (coppia di oligonucleotidi gro1/groFP, Tabella 4) al cui interno si trova la sequenza del promotore Pgro.	Questo lavoro
pGEM-T-Easy-Pmda66	Ottenuto dal vettore pGEM-T-Easy e contenente un frammento di 250 basi ottenuto tramite PCR (coppia di oligonucleotidi mda66PE/mda66rev2, Tabella 4) al cui interno si trova la sequenza del promotore Pmda66.	Questo lavoro
pTrcA	Vettore d'espressione, consente la fusione del gene d'interesse con la sequenza codificante una coda di sei istidine amminoterminale; Amp ^r .	Invitrogen
pTrcA-HrcA	Derivante dal vettore pTrcA, contenente la sequenza codificante HrcA, amplificata tramite PCR dal DNA genomico di <i>H. pylori</i> con la coppia di oligonucleotidi hrc-Nhe/hrc-Bam (Tabella 4), digerita con gli enzimi di restrizione <i>NheI/BamHI</i> .	(Roncarati et al., 2006)
pT7-7	Vettore d'espressione, Amp ^r .	(Tabor and Richardson, 1985)
pT7-7-HrcA	Ottenuto dal vettore pT7-7, contenente la sequenza codificante HrcA, amplificata tramite PCR dal DNA genomico di <i>H. pylori</i> con la coppia di oligonucleotidi hrcN-1/hrc-Bam (Tabella 4), digerita con gli enzimi di restrizione <i>NdeI/BamHI</i> .	(Roncarati et al., 2006)
pET22b	Vettore d'espressione, consente la fusione del gene d'interesse con la sequenza codificante una coda di sei istidine carbossiterminale; Amp ^r .	Novagen
pET22b-GroEL	Derivante dal vettore pET22b, contenente la sequenza codificante GroEL, amplificata tramite PCR dal DNA genomico di <i>H. pylori</i> con la coppia di oligonucleotidi groEL-fwd/groEL-rev (Tabella 4), digerita con gli enzimi di restrizione <i>NdeI/XhoI</i> .	Questo lavoro
pET22b-GroES	Derivante dal vettore pET22b, contenente la sequenza codificante GroES, amplificata tramite PCR dal DNA genomico di <i>H. pylori</i> con la coppia di oligonucleotidi groES-fwd/groES-rev (Tabella 4), digerita con gli enzimi di restrizione <i>NdeI/XhoI</i> .	Questo lavoro

pET22-HspR	Derivante dal vettore pET22b, contenente la sequenza codificante HspR, amplificata tramite PCR dal DNA genomico di <i>H. pylori</i> con la coppia di oligonucleotidi hspRN/hspRC (Tabella 4), digerita con gli enzimi di restrizione <i>NdeI/XhoI</i> .	(Spohn and Scarlato, 1999b)
pET22-HrcA	Derivante dal vettore pET22b, contenente la sequenza codificante HrcA, amplificata tramite PCR dal DNA genomico di <i>H. pylori</i> con la coppia di oligonucleotidi hrcN/hrcC (Tabella 4), digerita con gli enzimi di restrizione <i>NdeI/XhoI</i> .	(Roncarati et al., 2006)
pGEX 5X-1	Vettore d'espressione, consente la fusione del gene d'interesse con la sequenza codificante l'enzima Glutathione-S-Transferase (GST) in posizione amminoternale; Amp ^r .	Stratagene
pGEX-HrcA	Derivante dal vettore pGEX 5X-1, contenente la sequenza codificante HrcA, excisa dal plasmide pBS- <i>hrcA</i> tramite digestione con gli enzimi di restrizione <i>SalI/NotI</i> e ligata nel vettore pGEX 5X-1.	(Spohn et al., 2004)
pBluescript KSII(+) (pBS)	Vettore di clonaggio, Amp ^r	Stratagene
pBS- <i>hrcA</i>	Derivante dal plasmide pBS KSII(+), contenente il gene <i>hrcA</i> con il proprio promotore (oligonucleotidi <i>hrc1</i> e <i>hrcHrev</i> , Tabella 4).	(Spohn et al., 2004)
pBS- <i>hrcA</i> -HA	Derivante dal plasmide pBS- <i>hrcA</i> , contenente un inserto di 32 basi con estremità <i>HindIII-XhoI</i> , ottenuto appaiando gli oligonucleotidi HA-a e HA-b (Tabella 4) e codificante per un epitopo che si trova in una regione interna della proteina emoagglutinina del virus dell'influenza (sequenza amminoacidica dell'epitopo: YPYDVPDYA).	(Roncarati et al., 2006)
pBS- <i>cat-hrcA</i> -HA	Derivante dal plasmide pBS- <i>hrcA</i> -HA, contenente un frammento <i>EcoRI-BamHI</i> del gene <i>cat</i> (cassetta per la resistenza al cloramfenicolo) ottenuto dal vettore pDT2548.	(Roncarati et al., 2006)
pVAC- <i>cat-hrcA</i> -HA	Derivante dal vettore pVAC::km (Delany et al., 2002), linearizzato tramite digestione con l'enzima <i>BamHI</i> e ligato con un frammento di 1992 basi ottenuto attraverso parziale digestione con gli enzimi <i>BglII-BamHI</i> del costrutto pBS- <i>cat-hrcA</i> -HA.	(Roncarati et al., 2006)
pBS- <i>hrcA</i> -myc	Derivante dal plasmide pBS- <i>hrcA</i> ,	(Spohn et al.,

	contenente un inserto di 32 basi con estremità <i>HindIII-XhoI</i> , ottenuto appaiando gli oligonucleotidi <i>mycA</i> e <i>mycB</i> (Tabella 4) e codificante per l'epitopo umano c-Myc (sequenza amminoacidica dell'epitopo: EQKLISEEDL).	2004)
<i>pBS-cat-hrcA-myc</i>	Derivante dal plasmide <i>pBS-hrcA-HA</i> , contenente un frammento <i>EcoRI-BamHI</i> del gene <i>cat</i> (cassetta per la resistenza al cloramfenicolo) ottenuto dal vettore <i>pDT2548</i> .	(Spohn et al., 2004)
<i>pVAC-cat-hrcA-myc</i>	Derivante dal vettore <i>pVAC::km</i> (Delany et al., 2002), linearizzato tramite digestione con l'enzima <i>BamHI</i> e ligato con un frammento di 1992 basi ottenuto attraverso parziale digestione con gli enzimi <i>BglII-BamHI</i> del costrutto <i>pBS-cat-hrcA-HA</i> .	(Spohn et al., 2004)

Tabella 3. Plasmidi utilizzati in questo lavoro.

E.3 Oligonucleotidi

Nome	Sequenza (5' – 3')
<i>hrc1</i>	ATTATTGAATTCTTGGGTTAGGGGGATTTTAAGGG
<i>hrcHrev</i>	AGTAGAAGCTTCTGTTCCTCCTCAGAAATCGTTTG
<i>hrcA</i>	CAAACGCATCTAACAAACTCTC
<i>hrc-Bam</i>	ATATATGGATCCGGCTTAAATGATCGTGTTCTTGG
<i>hrcC</i>	ATTATTCTCGAGTTCCTCCTCAGAAATCGTTTGAAAAAAC
<i>hrcN</i>	ATTATTCATATGGTGATTGACGAGATTTTTCAAATAATG
<i>hrcN-1</i>	AAAATACATATGTTAAGAAGAATTAAAGTAGGTTC
<i>hrcA1</i>	TTCATTATAAAAACAAAAAGGATTATCC
<i>hrc-Nhe</i>	TTTAAAGCTAGCATGTTAAGAAGAATTAAAGTAGGTTC
<i>hrc3</i>	ATTATTGGATCCCAGTTTGGAGCGTTTAGAAAGAG

hrc4	TGTTTTGAAATTCTgCAGGGCGTGTTACTAGCATG
hrc6	TTTTTTGGATCCGCCAACTCTTTTAAGCGTTTAG
hsp1	TAGTTAGAATTCCTTTTAATTGCGCTGAAACGGG
hsp2	ATATATGGATCCGGGTGCACGCCTAAGATTTTAGCC
hsp3	AAAAATGGATCCACCCCTACGAATTTTTACGAATTG
hsp4	AAGGTTCTGCAGCGTATCATCGCTATAAGATCCATC
gro1	ATTATTGGATCCAGGGATGATGATGCCTGAACTGG
groFP	ATAAGGTTTGTTAATAACGCCCTTTCTC
groEL-fwd	ATTACATACCATATGGCAAAGAAATCAAATTTTC
groEL-rev	ATATATCTCGAGCATCATGCCACCCATGCCTC
groES-fwd	ATTACATACCATATGAAGTTTCAGCCATTAGGAG
groES-rev	ATATATCTCGAGGTGTTTTTTGTGATCATGAC
mda66PE	TGGTCAGTCAAGGTTTCATTG
mda66rev2	ATCGTAGAACATGACCACTCCTTA
fla	GCATGAGAAGTTAAAGCGGC
HA-a	AGCTTGATATCTATCCTTATGATGTGCCTGATTATGCTTGATAGGATCC
HA-b	TCGAGGATCCTATCAAGCATAATCAGGCACATCATAAGGATAGATATCA
mycA	AGCTTATTAGTGAGGAAGACCTATAATAGATC
mycB	TCGAGATCTATTATAGGTCTTCCTCACTAATA

Tabella 4. Oligonucleotidi utilizzati in questo lavoro.

E.4 Terreni di coltura

LB medium

10 g NaCl
10 g Tryptone
5 g Estratto di lievito
H₂O a volume di 1 litro,
portare a pH 7.0 con NaOH (0.2 ml 5N NaOH)

SOC medium

0.5 g NaCl
20 g Tryptone
5 g Estratto di lievito
H₂O a volume di 950 ml,
aggiungere 10 ml di 250 mM KCl,
portare a pH 7.0 con NaOH (0.2 ml 5N NaOH),
H₂O a volume di 1 litro, autoclavare,
raffreddare ad una temperatura inferiore a 60°C,
aggiungere 5 ml di 2 M MgCl₂ sterile,
aggiungere 20 ml di 1 M glucosio sterile.

Modified Brucella Broth

28 g Brucella Broth
H₂O a volume di 950 ml, autoclavare,
raffreddare fino a circa 50°C, aggiungere:
- 50 ml Fetal Calf Serum (FCS)
- 5 mg/l vancomycin
- 10 mg/l trimetoprim
- 6 mg/l cefsulodine
- 8 mg/l amphotericine B
- 100 mg/l cycloheximide

E.5 Piastre

Piastre di LB

10 g NaCl
10 g Tryptone
5 g Estratto di lievito
15 g Noble agar
H₂O a volume di 1 litro,
portare a pH 7.6 con NaOH

Piastre di Columbia-blood

44 g Columbia agar
H₂O a volume di 950 ml, autoclavare,
raffreddare fino a 50°C, aggiungere:

- 50 ml horse blood
- 0.2% cyclodextrin
- 5 mg/l vancomycin
- 10 mg/l trimetoprim
- 6 mg/l cefsulodine
- 8 mg/l amphotericine B
- 100 mg/l cycloheximide

Piastre per il saggio di motilità di *H. pylori*

28 g Brucella Broth
3 g Noble agar
H₂O a volume di 900 ml, autoclavare,
raffreddare fino a circa 50°C, aggiungere:

- 100 ml Fetal Calf Serum (FCS)
- 5 mg/l vancomycin
- 10 mg/l trimetoprim
- 6 mg/l cefsulodine
- 8 mg/l amphotericine B
- 100 mg/l cycloheximide

Antibiotici:

Stock solutions:

Ampicillina	100 mg/ml	in H ₂ O
Cloramfenicolo	30 mg/ml	in etanolo
Kanamicina	25 mg/ml	in H ₂ O
Vancomycin	10 mg/ml	in H ₂ O
Trimetoprim	10 mg/ml	in N-N-dimethylformamide
Cefsulodine	10 mg/ml	in H ₂ O
Amphotericine B	10 mg/ml	in dimethylsulfoxide
Cycloheximide	10 mg/ml	in acetone

E.6 Reagenti chimici ed enzimi

I reagenti chimici utilizzati in questo lavoro sono stati acquistati dai seguenti fornitori: BDH, Biokar Diagnostic, Biorad, Carlo Erba, Difco, Fluka, GE Healthcare, Merck, Oxoid, Promega, Qiagen, Serva, Sigma, United States Biochemical (USB). Gli enzimi di restrizione e di modificazione utilizzati sono stati acquistati dai fornitori Invitrogen, New England Biolabs, Promega. I

nucleotidi marcati con isotopi radioattivi sono stati forniti da GE Healthcare (former Amersham).

E.7 Strumentazione

Agitatore basculante: - M103-BA, MPM instruments
Piattaforma agitante: -Innova 2000, New Brunswick Scientific
Agitatore magnetico: - Ika Werke RCT basic e Heidolph MR 2002
Bagnetto termostato: - Memmert WB/WBU.
Bilancia elettronica: - BelEngineering MARK1300.
Camere per elettroforesi: - BioRad Sub-Cell GT Electrophoresis System.
- BioRad Mini-PROTEAN 3 Cell.
Centrifughe: - Eppendorf minispin.
- Beckman Avanti J-25.
- ALC PK121R.
Gel dryer: - BioRad gel dryer 583, pompa BioRad hydrotech vacuum pump.
Heater block: - MPM instruments M502-HBD.
Incubatori: - KW camera termostatica w86 e w96.
- Gallenkamp 10X400.XX2.
- Thermo Forma Serie II, water jacketedn CO₂ incubator,
HEPA filter.
pHmetro: - Crison Basic 20.
Speedvacum:- SVPT Savant SpeedVac.
Spettrofotometro:- Beckman DU640.
Transilluminatori: - Pharmacia Biotech Image Master VDS
- BioRad 2000.
PhosphoImager: - Molecular Dynamics PhosphoImager.

F. Metodi

F.1 Condizioni di crescita dei ceppi batterici

I ceppi di *Escherichia coli* DH-5 α e BL21 (DE3) (Tabella 1) sono stati cresciuti in terreno Luria-Bertani (LB) e, quando necessario, gli antibiotici ampicillina e kanamicina sono stati addizionati ad una concentrazione finale, rispettivamente, di 100 $\mu\text{g/ml}$ e 25 $\mu\text{g/ml}$.

I ceppi di *Helicobacter pylori* (Tabella 2), sono stati rivitalizzati da glicerinati, conservati a -80°C , su piastre di terreno Columbia (vedere 'Materiali') per due/tre giorni a 37°C , in giare, in condizioni microaerofile. Dopo averle ripiastrate su piastre fresche, le cellule sono state cresciute in un incubatore a CO_2 ad atmosfera controllata (9% CO_2 - 91% aria e 95% umidità). *H. pylori* è stato cresciuto in liquido in terreno Brucella Broth modificato (vedere 'Materiali') in incubatore a CO_2 .

F.2 Saggio di motilità su piastra

Per il saggio di motilità su piastra, le cellule di *H. pylori* dei ceppi inclusi nell'analisi sono state rivitalizzate da glicerinati come descritto sopra. Successivamente, i batteri sono stati inoculati, con il puntale di una pipetta, a metà dello spessore di una piastra semisolidi di terreno Brucella modificato (composizione descritta nei 'Materiali') ed incubati a 37°C nell'incubatore ad atmosfera controllata per 72 ore.

F.3 Preparazione di cellule competenti di *E. coli*

Per la preparazione di cellule competenti di *E. coli*, 1 colonia di cellule del ceppo desiderato, cresciute ON su piastra, viene inoculata in 5 ml di terreno SOC e cresciuta overnight a 37°C in continua agitazione. Il giorno successivo, un determinato volume della crescita overnight viene diluito in 125 ml di terreno SOC fresco, preriscaldato a 37°C , e cresciuto a 37°C in continua agitazione. Raggiunta una $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ pari a 0.4, le cellule sono centrifugate (10 min; 5000xg; 4°C), risospese in 10 ml di Transformation Buffer TB (15 mM CaCl_2 ; 250 mM KCl; 10 mM Pipes; 55mM MnCl_2 , pH6.7 con KOH, sterile) ed incubate 10 min in ghiaccio; in seguito ad un'ulteriore centrifugazione (10

min; 5000xg; 4°C), il pellet è risospeso in 10 ml di TB, vengono aggiunti 700 µl di DMSO (dimetilsolfossido) e l'intero volume viene suddiviso in aliquote da 250 µl. Tali aliquote, congelate istantaneamente in azoto liquido, vengono conservate a -80°C.

F.4 Trasformazione di cellule *E. coli*

La quantità di DNA plasmidico desiderata viene aggiunta ad una aliquota di cellule competenti, preparate come descritto precedentemente, e la miscela viene incubata in ghiaccio per 30 min. Di seguito, le cellule vengono esposte a shock termico a 42°C per 1 min e quindi incubate in ghiaccio per altri 5 min. Successivamente al campione viene aggiunto 1 ml di terreno SOC, preriscaldato a 37°C, e la sospensione viene incubata a 37°C per 45 min, infine una parte o tutta la sospensione viene piastrata su una piastra contenente l'antibiotico di selezione appropriato.

F.5 Trasformazione di *H. pylori*

Le cellule di *H. pylori*, naturalmente competenti, dopo crescita overnight su piastra, vengono raccolte al centro di questa ed incubate a 37°C per 5 ore. Al termine dell'incubazione, 5-10 µg di DNA plasmidico linearizzato vengono aggiunti ai batteri. Dopo un'incubazione overnight a 37°C, i batteri vengono piastrati su terreno selettivo e incubati per 3-4 giorni a 37°C. Vengono isolate, quindi, varie colonie trasformanti ed analizzate per la corretta inserzione del frammento desiderato attraverso Southern Blot o PCR.

F.6 Generazione di ceppi mutanti e complementanti di *H. pylori*

I ceppi mutanti isogenici G27 (*hrcA::km*) e G27 (*hspR::km*) sono stati generati trasformando il ceppo G27 wild-type, come descritto precedentemente, rispettivamente con i plasmidi pGEM3-hrc1/6-km-hrc3/4 e pGEM3-hsp1/2-Km-hsp3/4 (Tabella 3). Il ceppo doppio mutante G27 (*hrcA::km; hspR::cm*) è stato generato trasformando il mutante G27 (*hrcA::km*) con il vettore pGEM3-hsp1/2-cm-hsp3/4 (Tabella 3). I ceppi complementanti G27(*hrcA-HA*) e G27(*hrcA-myc*) sono stati ottenuti trasformando il mutante G27 (*hrcA::km*), rispettivamente, con i plasmidi pVAC-cat-*hrcA-HA* e pVAC-cat-*hrcA-myc* (Tabella 3).

F.7 Conservazione dei ceppi batterici

Per la conservazione di cellule di *E. coli*, il volume desiderato di una crescita overnight viene unito a glicerolo 100% sterile per avere una concentrazione finale di glicerolo del 20%; lo stock viene conservato a -80°C. I ceppi di *H. pylori* sono conservati in modo analogo, in terreno Brucella modificato, 20% glicerolo a -80°C.

F.8 Manipolazione del DNA

Tutte le manipolazioni del DNA sono state eseguite seguendo i protocolli descritti da Sambrook *et al.* (Sambrook et al., 1989). Gli enzimi di restrizione e di modificazione del DNA sono stati utilizzati seguendo le istruzioni fornite dai fornitori. Le preparazioni di DNA plasmidico sono state eseguite con kit specifici forniti dalla Qiagen, Inc. (Qiagen Mini o Midi column plasmid purification kit). I frammenti di DNA da clonare all'interno di vettori sono stati estratti da gel di agarosio e purificati utilizzando il Qiagen Gel Extraction kit (Qiagen, Inc.).

F.9 Ligazione di frammenti di DNA all'interno di vettori

Per inserire un frammento di DNA all'interno di un vettore, attraverso la formazione di legami fosfodiesterici, catalizzata dall'enzima T4 DNA Ligasi, entrambe le molecole di DNA devono avere estremità compatibili. Nel caso di estremità coesive, la quantità di vettore e di inserto da utilizzare è calcolata in modo da avere nella reazione un rapporto molare vettore:inserto di 1:3. Brevemente 100 ng di plasmide linearizzato vengono uniti all'inserto digerito, 2-5 U di T4 DNA Ligasi (NEB), 10X Buffer T4 DNA Ligasi e H₂O per un volume finale di 10 µl. La reazione viene incubata per 1 ora a temperatura ambiente oppure a 16°C overnight, dopodichè il campione può essere utilizzato direttamente per trasformare cellule di *E. coli* competenti.

F.10 Estrazione di DNA genomico da cellule di *H. pylori*

Cellule di *H. pylori* derivanti da una coltura liquida da 5 ml vengono risospese in 580 µl di TE pH 8.0; vengono aggiunti, quindi, 30 µl di SDS 10% e 3 µl di Proteinasi K (20 mg/ml) e il campione viene incubato a 37°C per 1 ora. Successivamente si aggiungono 100 µl di 5 M NaCl e 80 µl di soluzione

CTAB/NaCl (0.2% CTAB; 10 mM Tris pH 8.0; 0.84 M NaCl; 2 mM EDTA); dopo aver mescolato vigorosamente, il campione viene incubato a 65°C per 10 min. Segue un'estrazione con 1 volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) e una ulteriore con cloroformio:alcol isoamilico (24:1); il DNA genomico, contenuto nella fase acquosa, viene precipitato con 0.7 volumi di isopropanolo, centrifugando per 10 minuti a 13000xg 4°C. Dopo aver lavato il pellet con 1 ml di etanolo freddo al 70% ed averlo lasciato asciugare all'aria per qualche minuto, il DNA genomico viene risospeso in un volume appropriato di H₂O.

F.11 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Le reazioni di amplificazione tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) sono state eseguite in un termociclatore Perkin-Elmer utilizzando l'enzima Taq polimerasi (NEB). In ciascuna reazione, 50 ng di DNA genomico di *H. pylori* viene unito a 40 pmoli di ciascun oligonucleotide specifico in un volume finale di 50 µl contenente anche i dNTPs alla concentrazione di 200 µM ciascuno e 5 µl di 10X PCR Buffer contenente Mg²⁺. Vengono eseguiti 33 cicli, in cui il DNA viene denaturato a 95°C per 1 min, segue il passaggio di annealing alla temperatura appropriata per 1 min, infine avviene l'estensione a 72°C per 1 min.

F.12 Deprotezione degli oligonucleotidi

Tutti gli oligonucleotidi utilizzati in questo studio sono stati sintetizzati tramite un sintetizzatore automatico che utilizza il metodo del fosfoamidito. Al termine della sintesi, l'oligonucleotide viene adsorbito ad una matrice porosa e pertanto deve essere deprotetto e purificato prima dell'utilizzo. Brevemente, l'oligonucleotide viene eluito dal supporto poroso tramite l'aggiunta di 2 ml di 30% NH₃ ed incubazione per 2 ore a 65°C. Successivamente, il primer viene precipitato con 2 volumi di etanolo e 1/10 di volume di NaOAc 3M pH 5.2, lavato con 70% etanolo, e risospeso in H₂O bidistillata o TE.

F.13 Analisi di acidi nucleici attraverso gel di agarosio

Per la separazione di acidi nucleici di lunghezza maggiore di 100 basi si è utilizzata l'elettroforesi orizzontale in gel di agarosio. Brevemente, la

quantità di agarosio desiderata (concentrazione di agarosio nel gel variabile da 0.5% a 2% in base alle dimensioni delle molecole da separare) viene disciolta, attraverso bollitura, in 50 ml di tampone 1X TBE (90 mM Tris-HCl pH 8.3; 90 mM acido bórico; 2.5 mM EDTA), raffreddata a circa 50°C, miscelata con 2.5 µl di etidio bromuro (10 mg/ml) e versata nella vaschetta contenente il pettine per formare i pozzetti. Una volta solidificato, il gel viene inserito nella camera di corsa, ricoperto di tampone 1X TBE, il pettine viene rimosso ed i pozzetti vengono caricati con i campioni da analizzare. Infine viene applicato un voltaggio costante di 5 V/cm per 45 min. I frammenti di DNA/RNA così separati vengono visualizzati esponendo il gel a raggi UV attraverso un transilluminatore.

F.14 Analisi di proteine attraverso SDS-PAGE

I gel denaturanti di poliacrilammide contenenti SDS sono stati utilizzati per separare miscele di proteine in base al loro peso molecolare. Essi consistono di un gel accumulato al 5% di poliacrilammide e di un gel di separazione con percentuale di acrilammide variabile dall'8 al 15%. Per la preparazione del gel di separazione sono stati utilizzati i seguenti reagenti nelle proporzioni indicate in Tabella 6 (i valori indicati si riferiscono ad un volume di 5 ml, sufficiente per la preparazione di 1 gel di dimensioni 8 x 5 cm, spessore 0.75 mm):

	8%	10%	12%	15%
H₂O	2.3 ml	1.9 ml	1.6 ml	1.1 ml
30% acrilammide	1.3 ml	1.7 ml	2.0 ml	2.5 ml
N,N'bisacrilammide (29:1)				
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml
10% SDS (w/v)	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
10% Ammonio persolfato (w/v)	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
TEMED	0.002 ml	0.002 ml	0.002 ml	0.002 ml

Dopo aver aggiunto gli agenti catalizzatori della polimerizzazione APS e TEMED, il gel viene versato tra i due vetri separati da uno spaziatore spesso 0.75 mm; una volta aggiunto un film di acqua al pelo superiore del gel, per

isolarlo dall'aria e per ottenere una superficie regolare, il gel viene fatto polimerizzare per 30 min. Una volta polimerizzato il gel di separazione, viene preparato il gel di accumulo mischiando in un beaker i seguenti reagenti:

- 1.4 ml H₂O
- 0.33 ml 30% acrilammide:N,N'bisacrilammide (29:1)
- 0.25 ml 1.0 M Tris (pH 6.8)
- 0.02 ml 10% SDS (w/v)
- 0.02 ml 10% APS
- 0.002 ml TEMED

Dopo aver rimosso lo strato di acqua sopra il gel polimerizzato, il gel di accumulo viene versato tra i due vetri nello spazio tra il gel di separazione e la parte superiore dei due vetri; viene quindi inserito il pettine per creare i pozzetti. Una volta polimerizzato il gel di accumulo, il pettine viene rimosso, i pozzetti vengono lavati con acqua distillata e il gel viene montato nella cella di corsa. Infine, viene aggiunto il tampone di corsa nella cella elettroforetica (25 mM Tris; 250 mM glicina, 0.1% SDS), vengono caricati i campioni proteici (preparati in 1X SDS Loading Buffer (50 mM Tris-Cl pH 6.8; 100 mM dithiothreitol (DTT); 2% SDS; 0.1% Blu di bromofenolo; 10% glicerolo) e bolliti per 5 min)) ed applicato un voltaggio costante pari a 180 V. Al termine della corsa (quando il blu di bromofenolo è giunto al termine del gel, circa 60 min) i vetri vengono separati e il gel può essere o colorato con blu di Coomassie o utilizzato per un Western Blot.

F.15 Colorazione del gel di poliacrilammide con blu di Coomassie

Per la colorazione con blu di Coomassie, il gel viene immerso per 15 min nella soluzione di colorazione (0.1% (w/v) Coomassie Blue R-250; 45% metanolo; 10% acido acetico) e successivamente nella soluzione di decolorazione (25% metanolo; 7% acido acetico) per un periodo di tempo sufficiente ad ottenere il grado di decolorazione desiderato.

F.16 Western blot

I campioni da analizzare vengono caricati su gel di poliacrilammide denaturante al 12% (SDS-PAGE). In seguito ad elettroforesi, le proteine sono

trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Amersham) utilizzando un apparato per trasferimento semidry (Hoefer-semidry transfer apparatus): in particolare, si applica un voltaggio costante pari a 15 V per 20 min ed si utilizza come tampone di trasferimento 0.25X Tris-Glycine Buffer (6.25 mM Tris-HCl; 62.5 mM glycine pH 8.3; 0.025% w/v SDS), contenente 20% (v/v) metanolo. Dopo aver effettuato il blocking della membrana per 1 ora a temperatura ambiente in PBS (Phosphate-Buffered Saline) contenente 5% latte in polvere e 0.05% Tween-20, questa viene incubata per 16 ore a 4°C con una diluizione appropriata di anticorpo primario (anticorpi primari utilizzati in questo lavoro: anticorpo policlonale rabbit anti-HA diluito 1:400, Santa Cruz Biotechnology, sc-805; anticorpo mouse anti-NikR diluito 1:1000, (Delany et al., 2005); anticorpo monoclonale mouse anti-His tag diluito 1:1000, Invitrogen) in Blocking Buffer (5% milk-1X PBS- Tween-20). La membrana viene, quindi, lavata brevemente in PBST (1X PBS contenente 0.05% Tween-20) e incubata per 1 ora a temperatura ambiente con una diluizione appropriata di anticorpo secondario coniugato con l'enzima HRP (Horse Radish Peroxidase). Infine, il segnale viene generato tramite il kit ECL (Amersham) e la membrana viene esposta ad una lastra radiografica (Kodak).

F.17 Espressione e purificazione di proteine ricombinanti

Per l'espressione delle proteine HspR, GroES e GroEL di *H. pylori*, i vettori d'espressione ricombinanti pET22b-HspR, pET22b-GroES e pET22b-GroEL (Tabella 3) sono stati trasformati in cellule di *E. coli* BL21 (DE3). Batteri di questi ceppi trasformanti, cresciuti overnight, sono stati diluiti 1:50 in 250 ml di terreno LB, cresciuti fino ad $OD_{600} = 0.5$, ed indotti tramite aggiunta di IPTG 1 mM. La crescita delle colture è proseguita per altre 4 ore a 37°C: le cellule sono state recuperate per centrifugazione (6000xg, 4°C, 30 min). I batteri sono stati, quindi, risospesi in 25 ml di Lysis Buffer freddo (50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; 10 mM imidazolo; pH 8.0) ed incubati con lisozima (1 mg/ml) a 4°C per 30 min su un Tilt-Roll. Le cellule sono state lisate con due passaggi attraverso la French Pressure Cell, incubate in ghiaccio per 15 min con 10 µg/ml di DNasi e RNasi, e centrifugate per rimuovere i debris cellulari (6000xg, 30 min, 4°C). A ciascuna delle frazioni solubili ottenute sono stati aggiunti 750 µl matrice al 50% Ni²⁺-NTA (Qiagen, Inc.) e

le sospensioni sono state incubate per 120 min a 4°C su un Tilt-Roll. Le sospensioni sono quindi state caricate su colonne di polipropilene: sono stati eseguiti due lavaggi, ciascuno con 7,5 ml di Wash Buffer 20 (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM imidazolo; pH 8.0) ed un lavaggio addizionale con 7,5 ml di Wash Buffer 50 (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 50 mM imidazolo; pH 8.0). Infine, le proteine ricombinanti sono state eluite dalle colonne con 1 ml di Elution Buffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM imidazolo; pH 8.0) per tre volte e dializzate contro 1X Storage Buffer (50 mM Tris pH 8.0; 50 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0.01% NP-40 Igepal per GroES and GroEL; 10 mM Tris pH 8.0; 50 mM NaCl; 10 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0.01% NP-40 Igepal per HspR) contenente 50% glicerolo. Le proteine ricombinanti purificate HspR-His, GroES-His e GroEL-His sono state quantificate allo spettrofotometro (Bradford assay, BioRad), analizzate su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e conservate a -20°C.

F.18 Over-espressione di HrcA

Inizialmente l'over-espressione di HrcA è stata eseguita partendo da una coltura overnight di cellule di *E. coli* BL21 (DE3), contenenti i diversi costrutti d'espressione (Tabella 3): la coltura è stata diluita 1:25 in 1 L di terreno LB e le crescite sono state fatte a diverse temperature, come indicato nei Risultati, fino ad una OD di 0.5-0.7. È stato quindi aggiunto IPTG ad una concentrazione finale compresa tra 0.2 mM e 1 mM, a seconda dei casi. Le cellule sono state recuperate per centrifugazione dopo 4 ore di induzione e conservate a -80°C. Aliquote di cellule (1 ml) sono state raccolte prima dell'aggiunta di IPTG (campione pre-induzione) e dopo 4 ore di induzione (campione post-induction). Dieci microlitri di ciascun campione, corrispondenti ad una OD₆₀₀ di 5, sono state analizzate su gel di poliacrilammide denaturante (SDS-PAGE). Per l'induzione in condizioni di shock termico, una coltura overnight di cellule di *E. coli* BL21 (DE3) contenenti il vettore d'espressione pTrcA-HrcA (Tabella 3) cresciuta a 37°C, è stata diluita 1:20 in 1 L di terreno LB fresco e cresciuta a 37°C per 30 min. Successivamente, la temperatura di crescita è stata alzata a 42°C per 90 min e l'espressione della proteina è stata indotta con l'aggiunta di 1 mM IPTG. Dopo

4 ore di induzione a 42°C, le cellule sono state raccolte per centrifugazione e trattate come descritto precedentemente.

F.19 Purificazione della proteina ricombinante His-HrcA

Cellule derivanti da una coltura di 1 L, indotte come descritto nel paragrafo precedente, sono state risospese in 30 ml Lysis Buffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM imidazolo, pH 8.0) freddo e incubate per 30 min con lisozima (1 mg/ml) a 4°C su un Tilt-Roll. I batteri sono stati lisati alla French Pressure Cell (2 passaggi) ed incubati in ghiaccio per 15 min con DNasi e RNasi (10 µg/ml ciascuna), ed il lisato è stato centrifugato per rimuovere il materiale insolubile (6000xg; 30 min; 4°C). Al sovranatante (frazione solubile) è stato aggiunto il detergente Triton X-100 ad una concentrazione finale di 0.05% (v/v); quindi, alla frazione solubile, è stata aggiunta la matrice al nichel (750 µl di matrice al 50% Ni²⁺-NTA fornita da Qiagen, Inc.), precedentemente equilibrata in 10 volumi di Lysis Buffer contenente 0.05% (v/v) Triton X-100; la sospensione risultante è stata incubata per 90 min a 4°C sul Tilt-Roll. La sospensione è stata caricata su una colonna di polipropilene; sono stati eseguiti due lavaggi, con 7,5 ml ciascuno di Wash Buffer 20 (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM imidazolo, pH 8.0) e due lavaggi con 7,5 ml di Wash Buffer 50 (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 50 mM imidazolo, pH 8.0). Infine, la proteina ricombinante His-HrcA è stata eluita aggiungendo in colonna 600 µl di Elution Buffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM imidazolo, pH 8.0) per 4 volte e dializzata contro 1X Binding Buffer (10 mM Tris pH 8.0; 50 mM NaCl; 10 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0.01% NP-40 Igepal) contenente 50% glicerolo. La proteina purificata His-HrcA è stata quantificata allo spettrofotometro (Bradford assay, BioRad), analizzata su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) e conservata a -20°C.

F.20 Preparazione della membrana interna da cellule di *H. pylori* per ultracentrifugazione su gradiente di saccarosio

La preparazione della membrana interna di *H. pylori* è stata eseguita come descritto precedentemente in letteratura (Crawford et al., 1998).

Brevemente, 50 ml di cellule di *H. pylori* G27(*hrcA-HA*) sono state cresciute fino ad $OD_{600} = 1.0$, centrifugate e risospese in 20 ml di Buffer di Lisi (20 mM KH_2PO_4 ; 50 mM KCl; 5 mM EDTA pH 8.0; 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF)) freddo. Successivamente i batteri sono stati lisati con due passaggi attraverso la French Pressure Cell e la sospensione risultante è stata centrifugata per eliminare i debris cellulari (6000xg; 15 min; 4°C). La frazione solubile, così ottenuta, è stata caricata su un gradiente di saccarosio (70%-15%) e ultracentrifugata per 3 ore (90000xg; 180 min; 4°C; sotto vuoto). La frazione contenente la membrana interna, localizzata all'interfaccia fra la soluzione di saccarosio al 15% e quella al 70%, è stata recuperata aspirandola dalla provetta di polipropilene con un ago sottile, dopodichè ultracentrifugata (90000xg; 16 ore; 4°C; sotto vuoto), ed infine risospesa in 500 µl di Buffer di Risospensione (20 mM NaH_2PO_4 ; 1 mM EDTA). Le membrane ottenute sono state conservate a -80°C in Membrane Storage Buffer (20 mM NaH_2PO_4 ; 5 mM EDTA pH 8.0; 25% saccarosio); la concentrazione di proteina totale presente nell'estratto è stata determinata attraverso un saggio spettrofotometrico (Bradford assay, BioRad).

F.21 Quantificazione spettrofotometrica di campioni proteici (Bradford assay)

Il metodo, descritto da Bradford nel 1976, sfrutta l'effetto ipercromico a 595 nm del colorante Coomassie Blue R-250 in seguito alla formazione di complessi con le proteine presenti nel campione. Il saggio permette di lavorare in un intervallo di linearità compreso tra 2 µg e 20 µg di proteina. Per la curva standard di taratura vengono utilizzate opportune diluizioni di una soluzione di albumina sierica bovina (BSA). Le diluizioni di BSA e dei campioni vengono fatte in un volume di 100 µl di tampone in cui è risospesa la proteina d'interesse, a cui vengono aggiunti 700 µl di H_2O e 200 µl di reagente 5X Bradford (BioRad). Ogni misura spettrofotometrica viene eseguita a $\lambda=595$ nm in triplicato.

F.22 Analisi di frammenti di DNA marcati radioattivamente attraverso elettroforesi su gel di poliacrilammide denaturante

I frammenti di DNA marcati radioattivamente di lunghezza compresa tra 60 e 250 basi sono stati analizzati tramite corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 6% (acrilammide: N,N'bisacrilammide 19:1) contenente 8 M urea (denaturante) . Per frammenti di dimensione minore si diminuisce la concentrazione di acrilammide. Per la preparazione di 50 ml di gel (sufficiente per un gel di dimensioni 50 x 20, spessore 0.4 mm) al 6%, si miscelano i seguenti reagenti:

- 10 ml di 30% acrilammide-N,N'bisacrilammide (19:1)
- 10 ml di 5X TBE
- 10 ml di H₂O
- 24 g urea in polvere

La soluzione viene posta in agitazione e leggermente riscaldata fino al completo discioglimento dell'urea. Vengono aggiunti quindi 350 µl di 10% ammonio persolfato e 18 µl di TEMED ed il gel viene immediatamente colato nello spazio tra i due vetri, separati da uno spaziatore di 0.4 mm; viene inserito il pettine e si lascia polimerizzare il gel per 45 min. Di seguito, viene rimosso il pettine, il gel viene inserito nell'apparato di corsa e viene aggiunto il tampone di corsa (1X TBE) nella camera superiore ed inferiore. Il gel viene percorso per 30 min a 1600 V costanti; una volta sciacquati accuratamente i pozzetti, vengono caricati i campioni e applicato un voltaggio costante (1500-1600 V) per circa 2 ore. Al termine della corsa, viene disassemblato l'apparato e vengono separati i vetri; il gel viene trasferito su un foglio di carta Whatman 3MM, essiccato nel gel dryer per 30 min a 80°C ed esposto ad una lastra autoradiografica.

F.23 Filter binding assay

Un frammento di DNA comprendente il promotore di *hrcA* (*Phrc*), ottenuto tramite la digestione del plasmide pGEM-T-Easy-*Phrc* (Tabella 3) con l'enzima *SalI*, è stato marcato alle estremità 5' tramite fosforilazione con l'enzima PNK (T4 polinucleotide kinase) utilizzando il radioisotopo [γ -³²P]-ATP (3000 Ci/mM, Amersham). Il frammento marcato è stato purificato tramite estrazione da gel di poliacrilammide, precipitato con etanolo e risospeso in H₂O. Per la reazione di legame, approssimativamente 20 fmoli della sonda marcata sono state incubate con quantità crescenti della proteina

purificata His-HrcA in 25 μ l di Binding Buffer (10 mM Tris pH 8.0; 50 mM NaCl; 10 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 0.01% NP-40; 10% glicerolo) contenente 200 ng di DNA sonicato di sperma di salmone, utilizzato come competitore non-specifico. Dopo un'incubazione di 15 min a temperatura ambiente, i campioni sono stati caricati su filtri di nitrocellulosa (dimensione dei pori 0.45 μ m), equilibrati precedentemente in Binding Buffer, e posti su un apparato da vuoto. Successivamente è stato applicato il vuoto e ciascun filtro è stato immediatamente lavato con 1 ml di Binding Buffer. I filtri sono stati asciugati completamente all'aria e la radioattività ritenuta sul filtro è stata quantificata utilizzando uno scintillatore (liquid scintillation counter; Packard, 2000CA). La lettura, per ciascun campione, è stata corretta sottraendo le conte del campione senza proteina (background) ed è stata calcolata la percentuale di DNA trattenuto ad ogni concentrazione di proteina, rispetto al segnale dell'input.

F.24 Marcatura radioattiva di frammenti di DNA ad una estremità

Per esperimenti di DNasi I footprinting è necessario utilizzare, come sonda, DNA marcato radioattivamente ad una delle due estremità. Per fare ciò, il frammento di interesse viene amplificato mediante PCR e clonato nel vettore pGEM-T o pGEM-T-Easy; solitamente si utilizzano sonde di lunghezza compresa tra 200 e 400 basi. Nel presente lavoro sono stati marcati in questo modo frammenti di DNA, comprendenti i promotori degli operoni *hrcA-grpE-dnaK* e *groES-groEL*, clonati nel vettore pGEM-T-Easy (in particolare si vedano i costrutti pGEM-T-Easy-*Phrc* e pGEM-T-Easy-*Pgro* in Tabella 3). Una quantità pari ad 1,5 pmoli del risultante vettore ricombinante viene digerito con un enzima di restrizione che produce una 5'-overhang del filamento che si vuole marcare (ad una estremità della sonda) e i due termini 5' generatisi, a seguito del taglio, vengono defosforilati con 10 U di CIP (Calf Intestinal Phosphatase, NEB) a 37°C per qualche ora. Il DNA viene purificato tramite colonna (PCR purification kit, Qiagen Inc.) e i due termini 5' vengono marcati per fosforilazione aggiungendo 1 μ l di T4-PNK (10U/ μ l, NEB), 3 μ l di [γ -³²P]-ATP (10 μ Ci/ μ l, Amersham), 4 μ l 10X PNK Buffer (fornito con l'enzima) e H₂O fino a raggiungere un volume di 40 μ l; la reazione viene incubata per 30 min a 37°C. Viene quindi aggiunto un secondo enzima di

restrizione che taglia all'altra estremità della sonda, assieme al tampone 1X appropriato e all'acqua necessaria a portare il volume di reazione a 60 µl; la reazione di digestione viene incubata a 37°C per 2 ore. Il campione viene quindi caricato su un gel nativo di poliacrilammide al 4% e l'elettroforesi viene effettuata per 2 ore a 200 V costanti in 1X TBE. Il gel viene quindi esposto ad una lastra autoradiografica per 5 min e la banda d'interesse viene localizzata con l'aiuto della lastra sviluppata. La sezione di gel contenente il frammento marcato viene tagliata utilizzando un bisturi, immersa in 1,5 ml di tampone di eluizione (10 mM Tris pH 8.0; 1 mM EDTA; 300 mM NaOAc pH 5.2; 0.2 % SDS) ed incubata per 16 ore a 37°C in agitazione. Successivamente, il DNA viene purificato tramite estrazione con 1 volume di fenolo:cloroformio e precipitato con 2,5 volumi di etanolo a temperatura ambiente. Il frammento marcato viene infine risospeso in 100 µl di 10 mM Tris pH 8.0 e conservato a -20°C.

F.25 DNase I footprinting

I frammenti di DNA contenuti i promotori degli operoni *groES-groEL* e *hrcA-grpE-dnaK* sono stati marcati radioattivamente ad una estremità come descritto precedentemente; circa 10000 cpm di ciascun probe è stato utilizzato in ciascuna reazione di footprinting. Brevemente, i frammenti marcati sono stati incubati, per 15 min a temperatura ambiente, con quantità crescenti di proteina purificata in un volume di reazione di 50 µl in Footprinting Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 0.01% NP-40, 10% glicerolo) contenente 250 ng di DNA sonicato di sperma di salmone, utilizzato come competitore non-specifico. Successivamente sono stati aggiunti a ciascuna reazione 2 µl di DNasi I (0.01 U/µl), diluita immediatamente prima dell'uso in Footprinting Buffer contenente 5 mM CaCl₂, e le reazioni di digestione sono state incubate per 75 sec a temperatura ambiente. Le digestioni sono state, quindi, bloccate tramite l'aggiunta di 140 µl di Stop Buffer (192 mM NaOAc pH 5.2, 32 mM EDTA, 0.14% SDS, 64 µg/ml DNA sonicato di sperma di salmone). I campioni sono stati quindi purificati tramite estrazione con 1 volume di fenolo-cloroformio e precipitazione in etanolo. I frammenti di DNA sono stati risospesi in 10 µl di sequencing loading buffer (95% formammide; 0.01% blu

di bromofenolo), denaturati a 95°C per 2 min, e caricati su gel di poliacrilammide denaturante al 6%. Al termine dell'elettroforesi, il gel è stato essiccato per 1 ora a 80°C in un gel dryer (Biorad) ed esposto ad una lastra autoradiografica.

F.26 Reazione di sequenza G+A (Maxam and Gilbert sequencing reaction)

Per la reazione di sequenza G+A, a 20-50 fmol del frammento d'interesse, marcato ad una estremità, portato ad un volume di 8 µl con TE pH 7.5, viene aggiunto 1 µg DNA sonicato di sperma di salmone ed 1 µl di 50% acido formico e la reazione viene incubata a 37°C per 7 minu. Alla reazione vengono quindi aggiunti 150 µl di 1 M piperidina e l'incubazione viene prolungata per 3 min a 90°C. Dopo aver raffreddato i campioni per 5 min in ghiaccio, a ciascuna reazione vengono aggiunti 3 µl di tRNA (1 µg/µl) ed 1 ml di n-butanolo e il DNA tagliato viene recuperato per centrifugazione (10 min, 4°C, 13000 rpm). Il surnatante viene rimosso ed il DNA viene risospeso in 150 µl di 10% SDS e 1 ml di n-butanolo, centrifugato nuovamente (10 minuti, 4°C, 13000 rpm), lavato una volta con n-butanolo e quindi asciugato per 20 min in speed-vac. Infine, il DNA viene risospeso in Sequencing Loading Buffer (95% formammide, 0.01% blu di bromofenolo), bollito per 5 min e caricato, insieme ai campioni di footprint, su un gel di poliacrilammide denaturante.

F.27 Estrazione dell'RNA totale da cellule di *H. pylori*

L'RNA totale è stato estratto da cellule di *H. pylori* G27 wild-type, G27(*hrcA::km*), G27(*hspR::km*), G27(*hrcA::km-hspR::cm*) utilizzando un protocollo basato sull'estrazione con fenolo acido, messo a punto per cellule di *E.coli* [http://derisilab.ucsf.edu/microarray/pdfs/TotalRNA_from_Ecoli.pdf e Danielli, 2006 #2]. Brevemente, le cellule derivanti da una coltura liquida di 10 ml, cresciute fino ad OD600 = 0.8, vengono aliquotate in un tubo da 15 ml contenente 1,25 ml di Ethanol/Phenol Stop Solution (5% fenolo saturato con acqua (pH < 7.0) in etanolo), centrifugate e risospese in 800 µl di TE pH 8.0 contenente lisozima alla concentrazione di 0.5 mg/ml. Successivamente, si aggiungono 50 µl di SDS 10% ed i campioni vengono incubati per 2 min a 64°C. Al termine dell'incubazione, vengono aggiunti 88 µl

di 1 M NaOAc pH 5.2 e 1 ml fenolo saturato con acqua (pH < 7.0) e i campioni sono incubati a 64°C per 6 min ed agitati di tanto in tanto. I campioni vengono, quindi, raffreddati in ghiaccio per 5 min e centrifugati a 13000xg a 4°C per 10 min; la fase acquosa viene quindi prelevata e si esegue una estrazione con 1 volume di cloroformio. Alla fase acquosa risultante si aggiungono 2 volumi di etanolo e 0.1 volumi di 3 M NaOAc pH 5.2; l'RNA in etanolo viene conservato a -80°C. Prima di utilizzare l'RNA, sia in esperimenti di primer extension sia per i trascrittomi, un'aliquota di ciascuna preparazione viene precipitata, quantificata e caricata su un gel di agarosio all'1% per controllarne la purezza e l'integrità.

F.28 Marcatura di oligonucleotidi all'estremità 5'

Oligonucleotidi marcati radioattivamente all'estremità 5' sono stati utilizzati in saggi di primer extension. Brevemente, per la reazione di marcatura, a 5 pmoli dell'oligonucleotide vengono aggiunti 1 µl di enzima T4 PNK (10 U/µl, NEB), 3 µl di [γ -³²P]-ATP (10 µCi/µl), 1 µl 10X PNK Buffer (fornito con l'enzima) e H₂O fino a raggiungere un volume totale di reazione di 10 µl. Il campione viene incubato a 37°C per 30 mi e l'oligonucleotide marcato viene purificato tramite cromatografia per esclusione dimensionale (Chromaspin TE-10, Clontech), seguendo le istruzioni del fornitore.

F.29 Primer extension

Per ciascuna reazione di primer extension, 15 µg di RNA totale di *H. pylori* viene precipitato e centrifugato per 10 min, 13000xg a 4°C ed il pellet viene fatto asciugare all'aria per qualche minuto. Successivamente, l'RNA viene risospeso in 9 µl di una soluzione contenente 4 µl di H₂O, 2 µl di 5X AMV-RT-Buffer, 2 µl di dNTPs (2 mM ciascuno) e 1 µl di oligonucleotide marcato radioattivamente (0.1 pmoli/µl): il campione viene fatto bollire per 2 min e quindi posto a 42°C per 1 min. Successivamente, viene aggiunto 1 µl di enzima AMV-RT (Reverse Transcriptase, 10 U/µl; Promega) e il campione viene incubato a 42°C per 30 min. Dopo aver aggiunto 1 µl di RNasi A (10 µg/µl, DNasi-free), il campione viene incubato a temperatura ambiente per 10 min. Il volume della reazione viene portato a 100 µl con H₂O, viene fatta un'estrazione con 1 volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1),

l'RNA viene precipitato con 2,5 volumi di etanolo e 0.1 volumi di 3 M NaOAc pH 5.2, ed infine risospeso in 10 µl di Formamide Loading Buffer (95% formammide, 0,01% blu di bromofenolo). Dopo aver denaturato i campioni per 2 min a 95°C, questi vengono caricati su gel di poliacrilammide denaturante. Il gel viene essiccato al gel dryer ed esposto ad una lastra autoradiografica.

F.30 Analisi dei trascrittomi

I campioni di RNA totale sono stati estratti dai quattro ceppi utilizzati nell'analisi. Prima della retrotrascrizione, i campioni di RNA sono stati trattati con DNasi per eliminare eventuali tracce di DNA genomico presenti nella preparazione: in particolare, i campioni sono stati trattati con 1 U di RQ1 DNasi (RNasi-free, Promega) per µg di RNA ed incubati a 37°C per 30 min; l'RNA è stato purificato tramite un'estrazione con 1 volume di fenolo-cloroformio e precipitato in 2,5 volumi di etanolo e 0.1 volumi di 3M NaOAc pH 5.2. L'integrità dell'RNA trattato è stata controllata su gel d'agarosio all'1%. La sintesi di cDNA marcato è stata eseguita in un termociclatore (Perkin-Elmer): per ciascun campione, a 25-50 µg di RNA sono state aggiunte 150 pmoli di esameri random (Invitrogen), in un volume di reazione di 28 µl; i campioni sono stati denaturati per 3 min a 94°C, quindi è stato eseguito l'annealing a 37°C per 5 min. Successivamente, si è aggiunto l'enzima RT-AMV (25 U/reazione, Promega), [α -³³P]dATP, ed inibitore dell'RNasi (80U/reazione, RNase inhibitor RNasin (Promega)) per un volume finale della reazione di retrotrascrizione di 50 µl. I campioni sono stati incubati a 37°C per 3 ore. Successivamente, la reazione è stata interrotta aggiungendo 2 µl di 0.5 M EDTA, l'RNA è stato degradato tramite trattamento con 0.15 N NaOH per 15 min a 37°C e quindi neutralizzato aggiungendo 17.5 µl di 1 M TrisCl pH 7.5. Il cDNA marcato è stato purificato tramite colonne Chromaspin-TE10 (Clontech) e ibridato ai macroarrays (*H. pylori* Panorama ORF arrays (Sigma-Genosys)), seguendo le istruzioni del fornitore. Le immagini degli arrays sono state acquisite utilizzando un phosphorimager (Storm phosphorimager, Molecular Dynamics). L'intensità di ciascuno spot sugli arrays è stata quantificata utilizzando il software ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics) ed ulteriormente analizzata Microsoft Excel. In

particolare, le intensità degli spot sono state normalizzate esprimendo il valore di ciascun gene come percentuale dell'intensità totale di tutti i geni sull'array. La significatività statistica dei rapporti di espressione di ciascun gene nei vari mutanti rispetto al ceppo wild-type è stata determinata utilizzando un programma disponibile in rete (Cyber-T, al sito: <http://visitor.ics.uci.edu/genex/cybert>). Per evitare un eccessivo background, sono stati scartati gli spot con valore percentuale inferiore a 0.005. In particolare, per ciascun gene, sono stati calcolati i rapporti medi $\Delta hrcA/wt$, $\Delta hspR/wt$ e $\Delta hrcA-\Delta hspR/wt$ dei segnali normalizzati, derivanti da tre diversi esperimenti; quindi, sono stati selezionati i rapporti con un valore maggiori di 1.5 o minori di -1.5 nel doppio mutante e in almeno uno dei singoli mutanti, e statisticamente ripetibili (P value ≤ 0.05).

G. Bibliografia

- Achtman, M., Azuma, T., Berg, D.E., Ito, Y., Morelli, G., Pan, Z.J., Suerbaum, S., Thompson, S.A., van der Ende, A. and van Doorn, L.J. (1999) Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol*, **32**, 459-470.
- Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U. and Berg, D.E. (1992) PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res*, **20**, 6221-6225.
- Allen, L.A., Schlesinger, L.S. and Kang, B. (2000) Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J Exp Med*, **191**, 115-128.
- Alm, R.A., Ling, L.S., Moir, D.T., King, B.L., Brown, E.D., Doig, P.C., Smith, D.R., Noonan, B., Guild, B.C., deJonge, B.L., Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F. and Trust, T.J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **397**, 176-180.
- Alm, R.A. and Trust, T.J. (1999) Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J Mol Med*, **77**, 834-846.
- Andersen, M.T., Brondsted, L., Pearson, B.M., Mulholland, F., Parker, M., Pin, C., Wells, J.M. and Ingmer, H. (2005) Diverse roles for HspR in *Campylobacter jejuni* revealed by the proteome, transcriptome and phenotypic characterization of an hspR mutant. *Microbiology*, **151**, 905-915.
- Andersen-Nissen, E., Smith, K.D., Strobe, K.L., Barrett, S.L., Cookson, B.T., Logan, S.M. and Aderem, A. (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9247-9252.
- Beier, D. and Frank, R. (2000) Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, **182**, 2068-2076.
- Beier, D., Spohn, G., Rappuoli, R. and Scarlato, V. (1998) Functional analysis of the *Helicobacter pylori* principal sigma subunit of RNA polymerase reveals that the spacer region is important for efficient transcription. *Mol Microbiol*, **30**, 121-134.
- Bereswill, S., Lichte, F., Vey, T., Fassbinder, F. and Kist, M. (1998) Cloning and characterization of the fur gene from *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett*, **159**, 193-200.
- Blaser, M.J. (1993) *Helicobacter pylori*: microbiology of a 'slow' bacterial infection. *Trends Microbiol*, **1**, 255-260.
- Blaser, M.J. (1999) Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *J Infect Dis*, **179**, 1523-1530.
- Blaser, M.J. and Berg, D.E. (2001) *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest*, **107**, 767-773.
- Bucca, G., Brassington, A.M., Hotchkiss, G., Mersinias, V. and Smith, C.P. (2003) Negative feedback regulation of dnaK, clpB and lon expression by the DnaK chaperone machine in *Streptomyces coelicolor*, identified

- by transcriptome and in vivo DnaK-depletion analysis. *Mol Microbiol*, **50**, 153-166.
- Bucca, G., Brassington, A.M., Schonfeld, H.J. and Smith, C.P. (2000) The HspR regulon of *Streptomyces coelicolor*: a role for the DnaK chaperone as a transcriptional co-repressor. *Mol Microbiol*, **38**, 1093-1103.
- Bucca, G., Ferina, G., Puglia, A.M. and Smith, C.P. (1995) The dnaK operon of *Streptomyces coelicolor* encodes a novel heat-shock protein which binds to the promoter region of the operon. *Mol Microbiol*, **17**, 663-674.
- Bukau, B. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol*, **9**, 671-680.
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. and Craig, E.A. (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell*, **101**, 119-122.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. and Covacci, A. (1996) cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14648-14653.
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N. and et al. (1993) Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5791-5795.
- Covacci, A., Falkow, S., Berg, D.E. and Rappuoli, R. (1997) Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? *Trends Microbiol*, **5**, 205-208.
- Cover, T.L. and Blaser, M.J. (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, **267**, 10570-10575.
- Crabtree, J.E., Figura, N., Taylor, J.D., Bugnoli, M., Armellini, D. and Tompkins, D.S. (1992) Expression of 120 kilodalton protein and cytotoxicity in *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*, **45**, 733-734.
- Crawford, J.A., Kaper, J.B. and DiRita, V.J. (1998) Analysis of ToxR-dependent transcription activation of ompU, the gene encoding a major envelope protein in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, **29**, 235-246.
- de Bernard, M., Papini, E., de Filippis, V., Gottardi, E., Telford, J., Manetti, R., Fontana, A., Rappuoli, R. and Montecucco, C. (1995) Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. *J Biol Chem*, **270**, 23937-23940.
- Del Giudice, G., Covacci, A., Telford, J.L., Montecucco, C. and Rappuoli, R. (2001) The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol*, **19**, 523-563.
- Delany, I., Ieva, R., Soragni, A., Hilleringmann, M., Rappuoli, R. and Scarlato, V. (2005) In vitro analysis of protein-operator interactions of the NikR and fur metal-responsive regulators of coregulated genes in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, **187**, 7703-7715.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. and Scarlato, V. (2002) Growth phase-dependent regulation of target gene promoters for binding of the essential orphan response regulator HP1043 of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, **184**, 4800-4810.

- Eaton, K.A. and Krakowka, S. (1994) Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, **62**, 3604-3607.
- Eaton, K.A., Morgan, D.R. and Krakowka, S. (1989) *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, **57**, 1119-1125.
- Ellis, J. (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature*, **328**, 378-379.
- Ellis, R.J. (1990) The molecular chaperone concept. *Semin Cell Biol*, **1**, 1-9.
- Ernst, F.D., Stoof, J., Horrevoets, W.M., Kuipers, E.J., Kusters, J.G. and van Vliet, A.H. (2006) NikR mediates nickel-responsive transcriptional repression of the *Helicobacter pylori* outer membrane proteins FecA3 (HP1400) and FrpB4 (HP1512). *Infect Immun*, **74**, 6821-6828.
- Ernst, P.B. and Gold, B.D. (2000) The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*, **54**, 615-640.
- Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W.A. and Hartl, F.U. (1997) In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell*, **90**, 491-500.
- Fassbinder, F., van Vliet, A.H., Gimmel, V., Kusters, J.G., Kist, M. and Bereswill, S. (2000) Identification of iron-regulated genes of *Helicobacter pylori* by a modified fur titration assay (FURTA-Hp). *FEMS Microbiol Lett*, **184**, 225-229.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M. and et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, **269**, 496-512.
- Foynes, S., Dorrell, N., Ward, S.J., Stabler, R.A., McColm, A.A., Rycroft, A.N. and Wren, B.W. (2000) *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa. *Infect Immun*, **68**, 2016-2023.
- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R. and Haas, R. (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*, **301**, 1099-1102.
- Georgopoulos, C. (1992) The emergence of the chaperone machines. *Trends Biochem Sci*, **17**, 295-299.
- Go, M.F., Kapur, V., Graham, D.Y. and Musser, J.M. (1996) Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. *J Bacteriol*, **178**, 3934-3938.
- Gobert, A.P., McGee, D.J., Akhtar, M., Mendz, G.L., Newton, J.C., Cheng, Y., Mobley, H.L. and Wilson, K.T. (2001) *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13844-13849.
- Goodwin, C.S. and Armstrong, J.A. (1990) Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **9**, 1-13.
- Gottesman, S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet*, **30**, 465-506.
- Grandvalet, C., de Crecy-Lagard, V. and Mazodier, P. (1999) The ClpB ATPase of *Streptomyces albus* G belongs to the HspR heat shock regulon. *Mol Microbiol*, **31**, 521-532.

- Grandvalet, C., Servant, P. and Mazodier, P. (1997) Disruption of hspR, the repressor gene of the dnaK operon in *Streptomyces albus* G. *Mol Microbiol*, **23**, 77-84.
- Grodberg, J. and Dunn, J.J. (1988) ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*, **170**, 1245-1253.
- Gross, C.A. (1996) *Function and regulation of the heat shock proteins*. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Washington D.C.: American Society for Microbiology Press.
- Haas, R., Meyer, T.F. and van Putten, J.P. (1993) Aflagellated mutants of *Helicobacter pylori* generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis. *Mol Microbiol*, **8**, 753-760.
- Haldenwang, W.G. (1995) The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev*, **59**, 1-30.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hecker, M., Schumann, W. and Volker, U. (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **19**, 417-428.
- Huesca, M., Borgia, S., Hoffman, P. and Lingwood, C.A. (1996) Acidic pH changes receptor binding specificity of *Helicobacter pylori*: a binary adhesion model in which surface heat shock (stress) proteins mediate sulfatide recognition in gastric colonization. *Infect Immun*, **64**, 2643-2648.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L. and Boren, T. (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, **279**, 373-377.
- Jiang, Q., Hiratsuka, K. and Taylor, D.E. (1996) Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol Microbiol*, **20**, 833-842.
- Kang, J. and Blaser, M.J. (2006) Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol*, **4**, 826-836.
- Kavermann, H., Burns, B.P., Angermuller, K., Odenbreit, S., Fischer, W., Melchers, K. and Haas, R. (2003) Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *J Exp Med*, **197**, 813-822.
- Kim, J.S., Chang, J.H., Chung, S.I. and Yum, J.S. (1999) Molecular cloning and characterization of the *Helicobacter pylori* fliD gene, an essential factor in flagellar structure and motility. *J Bacteriol*, **181**, 6969-6976.
- Kostrzynska, M., Betts, J.D., Austin, J.W. and Trust, T.J. (1991) Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J Bacteriol*, **173**, 937-946.
- Krukonis, E.S., Yu, R.R. and Dirita, V.J. (2000) The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol Microbiol*, **38**, 67-84.
- Labigne, A., Cussac, V. and Courcoux, P. (1991) Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol*, **173**, 1920-1931.

- Lepper, P.M., Triantafilou, M., Schumann, C., Schneider, E.M. and Triantafilou, K. (2005) Lipopolysaccharides from *Helicobacter pylori* can act as antagonists for Toll-like receptor 4. *Cell Microbiol*, **7**, 519-528.
- Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G. and Haas, R. (1992) Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol Microbiol*, **6**, 2863-2874.
- Lindholm, C., Quiding-Jarbrink, M., Lonroth, H., Hamlet, A. and Svennerholm, A.M. (1998) Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect Immun*, **66**, 5964-5971.
- Lindholm, C., Quiding-Jarbrink, M., Lonroth, H. and Svennerholm, A.M. (2001) Induction of chemokine and cytokine responses by *Helicobacter pylori* in human stomach explants. *Scand J Gastroenterol*, **36**, 1022-1029.
- Lupetti, P., Heuser, J.E., Manetti, R., Massari, P., Lanzavecchia, S., Bellon, P.L., Dallai, R., Rappuoli, R. and Telford, J.L. (1996) Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol*, **133**, 801-807.
- Macchia, G., Massone, A., Burrioni, D., Covacci, A., Censini, S. and Rappuoli, R. (1993) The Hsp60 protein of *Helicobacter pylori*: structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases. *Mol Microbiol*, **9**, 645-652.
- Marshall, B.J. and Warren, J.R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, **1**, 1311-1315.
- Miller, V.L., Taylor, R.K. and Mekalanos, J.J. (1987) Cholera toxin transcriptional activator toxR is a transmembrane DNA binding protein. *Cell*, **48**, 271-279.
- Minder, A.C., Fischer, H.M., Hennecke, H. and Narberhaus, F. (2000) Role of HrcA and CIRCE in the heat shock regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol*, **182**, 14-22.
- Missiakas, D., Mayer, M.P., Lemaire, M., Georgopoulos, C. and Raina, S. (1997) Modulation of the *Escherichia coli* sigmaE (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol*, **24**, 355-371.
- Missiakas, D. and Raina, S. (1997) Protein misfolding in the cell envelope of *Escherichia coli*: new signaling pathways. *Trends Biochem Sci*, **22**, 59-63.
- Mizuno, T. (1997) Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res*, **4**, 161-168.
- Mobley, H.L., Mendz, G.L. and Hazell, S.L. (2001) *Helicobacter pylori*. *Physiology and genetics*. ASM Press.
- Model, P., Jovanovic, G. and Dworkin, J. (1997) The *Escherichia coli* phage-shock-protein (psp) operon. *Mol Microbiol*, **24**, 255-261.
- Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, F.X. and Schumann, W. (1997) The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Embo J*, **16**, 4579-4590.
- Mogk, A. and Schumann, W. (1997) Cloning and sequencing of the hrcA gene of *Bacillus stearothermophilus*. *Gene*, **194**, 133-136.

- Mohammadi, M., Czinn, S., Redline, R. and Nedrud, J. (1996) Helicobacter-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J Immunol*, **156**, 4729-4738.
- Mohammadi, M., Nedrud, J., Redline, R., Lycke, N. and Czinn, S.J. (1997) Murine CD4 T-cell response to Helicobacter infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology*, **113**, 1848-1857.
- Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A. and Montecucco, C. (1998) Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by Helicobacter pylori toxin VacA. *J Exp Med*, **187**, 135-140.
- Moran, A.P., Lindner, B. and Walsh, E.J. (1997) Structural characterization of the lipid A component of Helicobacter pylori rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *J Bacteriol*, **179**, 6453-6463.
- Muotiala, A., Helander, I.M., Pyhala, L., Kosunen, T.U. and Moran, A.P. (1992) Low biological activity of Helicobacter pylori lipopolysaccharide. *Infect Immun*, **60**, 1714-1716.
- Narberhaus, F. (1999) Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol Microbiol*, **31**, 1-8.
- Narberhaus, F. (2002) Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 64-93; table of contents.
- Niehus, E., Gressmann, H., Ye, F., Schlapbach, R., Dehio, M., Dehio, C., Stack, A., Meyer, T.F., Suerbaum, S. and Josenhans, C. (2004) Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of Helicobacter pylori. *Mol Microbiol*, **52**, 947-961.
- Noach, L.A., Bosma, N.B., Jansen, J., Hoek, F.J., van Deventer, S.J. and Tytgat, G.N. (1994) Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with Helicobacter pylori infection. *Scand J Gastroenterol*, **29**, 425-429.
- O'Toole, P.W., Janzon, L., Doig, P., Huang, J., Kostrzynska, M. and Trust, T.J. (1995) The putative neuraminylactose-binding hemagglutinin HpaA of Helicobacter pylori CCUG 17874 is a lipoprotein. *J Bacteriol*, **177**, 6049-6057.
- O'Toole, P.W., Kostrzynska, M. and Trust, T.J. (1994) Non-motile mutants of Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae defective in flagellar hook production. *Mol Microbiol*, **14**, 691-703.
- Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G. and Haas, R. (1999) Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of Helicobacter pylori to human gastric tissue. *Mol Microbiol*, **31**, 1537-1548.
- Odenbreit, S., Wieland, B. and Haas, R. (1996) Cloning and genetic characterization of Helicobacter pylori catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *J Bacteriol*, **178**, 6960-6967.
- Oh, J.D., Kling-Backhed, H., Giannakis, M., Xu, J., Fulton, R.S., Fulton, L.A., Cordum, H.S., Wang, C., Elliott, G., Edwards, J., Mardis, E.R., Engstrand, L.G. and Gordon, J.I. (2006) The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis Helicobacter pylori strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9999-10004.

- Osorio, C.R. and Klose, K.E. (2000) A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. *J Bacteriol*, **182**, 526-528.
- Ottemann, K.M. and Lowenthal, A.C. (2002) *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun*, **70**, 1984-1990.
- Papini, E., de Bernard, M., Milia, E., Bugnoli, M., Zerial, M., Rappuoli, R. and Montecucco, C. (1994) Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9720-9724.
- Pflock, M., Bathon, M., Schar, J., Muller, S., Mollenkopf, H., Meyer, T.F. and Beier, D. (2007) The orphan response regulator HP1021 of *Helicobacter pylori* regulates transcription of a gene cluster presumably involved in acetone metabolism. *J Bacteriol*.
- Pflock, M., Finsterer, N., Joseph, B., Mollenkopf, H., Meyer, T.F. and Beier, D. (2006) Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *J Bacteriol*, **188**, 3449-3462.
- Ramarao, N., Gray-Owen, S.D., Backert, S. and Meyer, T.F. (2000) *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. *Mol Microbiol*, **37**, 1389-1404.
- Reischl, S., Wiegert, T. and Schumann, W. (2002) Isolation and analysis of mutant alleles of the *Bacillus subtilis* HrcA repressor with reduced dependency on GroE function. *J Biol Chem*, **277**, 32659-32667.
- Roncarati, D., Spohn, G., Tango, N., Danielli, A., Delany, I. and Scarlato, V. (2006) Expression, purification and characterization of the membrane-associated HrcA repressor protein of *Helicobacter pylori*. *Protein Expr Purif*.
- Rossi, G., Fortuna, D., Pancotto, L., Renzoni, G., Taccini, E., Ghiara, P., Rappuoli, R. and Del Giudice, G. (2000) Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of beagle dogs experimentally infected with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, **68**, 4769-4772.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual, 2 nd edition*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Scarlato, V., Delany, I., Spohn, G. and Beier, D. (2001) Regulation of transcription in *Helicobacter pylori*: simple systems or complex circuits? *Int J Med Microbiol*, **291**, 107-117.
- Schulz, A. and Schumann, W. (1996) *hrcA*, the first gene of the *Bacillus subtilis* *dnaK* operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. *J Bacteriol*, **178**, 1088-1093.
- Schumann, W. (2003) The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell Stress Chaperones*, **8**, 207-217.
- Seifert, H.S., Chen, E.Y., So, M. and Heffron, F. (1986) Shuttle mutagenesis: a method of transposon mutagenesis for *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 735-739.
- Servant, P. and Mazodier, P. (2001) Negative regulation of the heat shock response in *Streptomyces*. *Arch Microbiol*, **176**, 237-242.

- Solnick, J.V., Hansen, L.M. and Syvanen, M. (1997) The major sigma factor (RpoD) from *Helicobacter pylori* and other gram-negative bacteria shows an enhanced rate of divergence. *J Bacteriol*, **179**, 6196-6200.
- Spiegelhalder, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E. and Kist, M. (1993) Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun*, **61**, 5315-5325.
- Spohn, G., Danielli, A., Roncarati, D., Delany, I., Rappuoli, R. and Scarlato, V. (2004) Dual control of *Helicobacter pylori* heat shock gene transcription by HspR and HrcA. *J Bacteriol*, **186**, 2956-2965.
- Spohn, G., Delany, I., Rappuoli, R. and Scarlato, V. (2002) Characterization of the HspR-mediated stress response in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*, **184**, 2925-2930.
- Spohn, G. and Scarlato, V. (1999a) Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homolog. *J Bacteriol*, **181**, 593-599.
- Spohn, G. and Scarlato, V. (1999b) The autoregulatory HspR repressor protein governs chaperone gene transcription in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, **34**, 663-674.
- Suerbaum, S. (1995) The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. *Trends Microbiol*, **3**, 168-170; discussion 170-161.
- Suerbaum, S., Josenhans, C. and Labigne, A. (1993) Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol*, **175**, 3278-3288.
- Suerbaum, S., Thiberge, J.M., Kansau, I., Ferrero, R.L. and Labigne, A. (1994) *Helicobacter pylori* hspA-hspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. *Mol Microbiol*, **14**, 959-974.
- Susin, M.F., Perez, H.R., Baldini, R.L. and Gomes, S.L. (2004) Functional and structural analysis of HrcA repressor protein from *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, **186**, 6759-6767.
- Tabor, S. and Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 1074-1078.
- Taylor, D.N. and Blaser, M.J. (1991) The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev*, **13**, 42-59.
- Teter, S.A., Houry, W.A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C. and Hartl, F.U. (1999) Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell*, **97**, 755-765.
- Thomas, J.E., Gibson, G.R., Darboe, M.K., Dale, A. and Weaver, L.T. (1992) Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet*, **340**, 1194-1195.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzegerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Hickey, E.K., Berg, D.E., Gocayne, J.D., Utterback, T.R., Peterson, J.D., Kelley, J.M., Cotton, M.D., Weidman, J.M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L.,

- Wallin, E., Hayes, W.S., Borodovsky, M., Karp, P.D., Smith, H.O., Fraser, C.M. and Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **388**, 539-547.
- Tsuda, M., Karita, M., Morshed, M.G., Okita, K. and Nakazawa, T. (1994) A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun*, **62**, 3586-3589.
- Ueguchi, C., Kakeda, M., Yamada, H. and Mizuno, T. (1994) An analogue of the DnaJ molecular chaperone in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1054-1058.
- Waidner, B., Melchers, K., Stahler, F.N., Kist, M. and Bereswill, S. (2005) The *Helicobacter pylori* CrdRS two-component regulation system (HP1364/HP1365) is required for copper-mediated induction of the copper resistance determinant CrdA. *J Bacteriol*, **187**, 4683-4688.
- Watanabe, K., Yamamoto, T. and Suzuki, Y. (2001) Renaturation of *Bacillus thermoglucosidasius* HrcA repressor by DNA and thermostability of the HrcA-DNA complex in vitro. *J Bacteriol*, **183**, 155-161.
- Weel, J.F., van der Hulst, R.W., Gerrits, Y., Roorda, P., Feller, M., Dankert, J., Tytgat, G.N. and van der Ende, A. (1996) The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis*, **173**, 1171-1175.
- Wetzstein, M., Volker, U., Dedio, J., Lobau, S., Zuber, U., Schiesswohl, M., Herget, C., Hecker, M. and Schumann, W. (1992) Cloning, sequencing, and molecular analysis of the dnaK locus from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **174**, 3300-3310.
- Wickner, S., Maurizi, M.R. and Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, **286**, 1888-1893.
- Wilson, A.C. and Tan, M. (2002) Functional analysis of the heat shock regulator HrcA of *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol*, **184**, 6566-6571.
- Wilson, A.C., Wu, C.C., Yates, J.R., 3rd and Tan, M. (2005) Chlamydial GroEL autoregulates its own expression through direct interactions with the HrcA repressor protein. *J Bacteriol*, **187**, 7535-7542.
- Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P.F., Telford, J.L., Figura, N., Rappuoli, R. and Covacci, A. (1995) Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun*, **63**, 94-98.
- Yokota, K., Hirai, Y., Haque, M., Hayashi, S., Isogai, H., Sugiyama, T., Nagamachi, E., Tsukada, Y., Fujii, N. and Oguma, K. (1994) Heat shock protein produced by *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol*, **38**, 403-405.
- Zhu, J., Miller, M.B., Vance, R.E., Dziejman, M., Bassler, B.L. and Mekalanos, J.J. (2002) Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3129-3134.
- Zuber, U. and Schumann, W. (1994) CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon dnaK of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **176**, 1359-1363.